

**Relatório Final de Estágio**  
**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

**ANÁLISE E CONTROLO DE MICOTOXINAS EM EXPLORAÇÕES DE  
BOVINOS DE LEITE**

**Ana Rita Violante Pedro**

Orientador

**Prof. Doutor António José Mira da Fonseca**

Co-Orientadores

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita**

**Eng. Pedro Miguel Madeira Ramos Caramona**

**Porto 2013**

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ANÁLISE E CONTROLO DE MICOTOXINAS EM EXPLORAÇÕES DE  
BOVINOS DE LEITE**

Ana Rita Violante Pedro

Orientador

**Prof. Doutor António José Mira da Fonseca**

Co-Orientadores

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Rita Jordão Bentes Cabrita**

**Eng. Pedro Miguel Madeira Ramos Caramona**

Porto 2013

# RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos a avaliação do manejo praticado em explorações comerciais de bovinos de leite da região do Entre-Douro e Minho e a identificação de parâmetros hematológicos indicativos do efeito da inclusão de um adsorvente de micotoxinas à base de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na imunidade de vacas leiteiras.

Numa primeira fase, procedeu-se à recolha de dados, com base no sistema HACCP, em 30 explorações, no sentido de avaliar a relação entre o uso de adsorventes de micotoxinas e as práticas de manejo, a saúde animal e a produção de leite. Observou-se uma relação significativa entre o uso de adsorventes e os indicadores de saúde animal, tendo a incorporação de Mycosorb® na dieta sido mais eficaz na melhoria dos indicadores de saúde geral comparativamente ao uso de outros adsorventes. Verificou-se, ainda, a existência de uma relação significativa entre o uso de adsorventes e o manejo praticado na exploração, que inclui manejo alimentar, manejo das forragens e manejo dos alimentos compostos. Estes dados sugerem um acompanhamento rigoroso e uma atitude preventiva dos produtores no que respeita ao risco de contaminação da dieta por micotoxinas.

A segunda fase do estudo incidiu numa exploração na qual foram descritas quebras de ingestão e de produção de leite associadas a diarreias em alguns animais. Este quadro terá coincidido com a abertura de um silo, poucos dias antes, no qual estava conservada silagem de milho contaminada com desoxinivalenol, fumonisinas e ácido fusárico. A avaliação hematológica antes e depois da incorporação do adsorvente permitiu verificar o efeito deste em parâmetros do hemograma e do proteinograma, nos quais as proteínas plasmáticas totais, as gamaglobulinas e as betaglobulinas se alteraram significativamente. Os resultados obtidos sugerem um efeito positivo do uso de Mycosorb® na imunidade animal.

Palavras-chave: Adsorventes de micotoxinas, bovinos de leite, hematologia, micotoxinas, programas de controlo.

# ABSTRACT

This study aimed to evaluate the management of dairy farms in the Entre-Douro e Minho and to identify hematological parameters that could indicate the effect of the inclusion of a mycotoxin binder, based on yeast cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, on immunity of dairy cows.

In the first stage of the experimental work, data based on HACCP was collected on 30 farms in order to access the connection between the use of mycotoxin binders and management practices, animal health and milk production. There was a significant association between the use of adsorbents and animal health parameters, in which the incorporation of Mycosorb® in the diet was more effective in improving general health parameters when compared to the use of other mycotoxin binders. There was also a significant association between the use of adsorbents and the management practiced in the farms, including feeding management, forage management and concentrate feeds management. These data suggest the existence of a close monitoring process and a preventive attitude of producers with regard to the risk of feeds' contamination by mycotoxins.

The second phase of the study was held on a dairy farm where losses of feed intake and milk production, associated with diarrhea were described. These symptoms coincided with the opening of a silo, few days before, where corn silage contaminated with deoxynivalenol, fumonisins and fusaric acid was preserved. The hematologic evaluation before and after the incorporation of the binder allowed the study of its effect on the hemogram and proteinogram parameters, in which the total plasma proteins, the immunoglobulins and betaglobulins changed significantly. The results suggest a positive effect of Mycosorb® on dairy cows' immunity.

Keywords: Control programs, dairy cattle, haematology, mycotoxins, mycotoxin binders.

# AGRADECIMENTOS

Gostaria, antes de mais, de agradecer ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), da Universidade do Porto, como instituição e como comunidade, por todos os anos de alegria, sorrisos e gargalhadas, mas também tristezas, angústias e anseios tão necessários à nossa formação quanto os primeiros.

Ao Prof. Doutor António Mira da Fonseca o mais profundo e sincero agradecimento por ter possibilitado este estágio, por toda a orientação, disponibilidade e atenção, quer como Orientador, mas também como Professor, um muito obrigada!!

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Rita Cabrita, pela formação que nos deu durante o nosso percurso académico, há 6 anos, tão necessária a esta etapa final e por toda a orientação e instruções imprescindíveis para o presente estudo!

Ao Eng. Pedro Caramona, da Alltech<sup>®</sup>, pela sua orientação, preocupação e presença constantes (mesmo quando longe!) e por possibilitar o estágio nesta área absolutamente fascinante!

Um agradecimento extraordinariamente especial à Eng.<sup>a</sup> Ana Gomes, Eng. André Carvalho, Eng.<sup>a</sup> Isabel Ramos, Dr.<sup>a</sup> Isabel Santos e Dr.<sup>a</sup> Joana Correia pela forma como me receberam, por toda a amabilidade, simpatia, apoio e conhecimentos que me transmitiram... por tornarem esta etapa inesquecível na minha formação académica!

À Cooperativa Agrícola de Vila do Conde (CAVC), na pessoa do seu Presidente, Sr. Fernando Capela, por todo o suporte que me foi prestado ao longo do estágio.

Ao Dr. Miguel Costa pela disponibilidade quando a sua cooperação foi indispensável.

À Arminda, à Lúcia, à Cristina, à Dra. Alice, à Eng.<sup>a</sup> Rosa, à Paula... a todos os restantes funcionários da CAVC que sempre me receberam com um sorriso no rosto.

À Teresa Santos, minha companheira de estágio, pela amizade que criamos, pela partilha de momentos e por todas as brincadeiras e “disparates” que fizemos.

A todos os produtores que participaram no estudo, pela transmissão de conhecimentos e por toda a colaboração, auxiliando-me a crescer como profissional.

À Cátia, ao Duda, à Di, à Raquel e à Cristina, pela amizade incondicional, por estarem sempre presentes mesmo quando não estão e por tornarem o meu mundo mais especial do que alguma vez seria se não existissem na minha vida.

À Nesi, à Maria Pia, à Renata, à Filipa, à Sara, ao Costinha, à Júlia e ao Tiago (de) Lima, por serem aquele grupo especial! À Rita Velho e à Jordana pelas horas de conversa infindáveis, pelos desabafos, por toda a amizade que lhes devo... a todos os amigos que fiz e a todos os colegas que me acompanharam ao longo do meu percurso académico no ICBAS, por partilharmos este caminho universitário juntos, por todo o apoio, amizade e companheirismo.

À Silke, Corinna, Charly, Marie, Simone, Vanessa, Sara, Emma, Teresa, Nina, Sonja, Mimi, Laura, Ioannis, Lara, Petra, Aldaír... e aos restantes colegas que, apesar de talvez nunca lerem este agradecimento ou de não o perceberem mesmo que o leiam, tornaram todos os momentos passados longe de casa tão felizes e mais facilmente suportáveis, um muito obrigada.

Por último, mas não por isso menos importante (muito pelo contrário!!) quero agradecer à minha família, a quem devo tudo aquilo que sou...

Aos meus pais, meu exemplo de vida, por me terem ensinado a ser quem sou... por serem as pessoas mais íntegras e correctas que conheço, um eterno obrigada... ao meu irmão, metade do meu ser, por me ter ensinado a crescer, por nunca ter duvidado daquilo que eu poderia um dia alcançar e por todos os momentos caricatos que criamos e passamos juntos.

À minha avó, minha segunda mãe, pela força que demonstra e que parece quase impossível alguém ter, pelo exemplo de coragem e determinação que me transmitiu, por tudo que me ensinou.

Ao Hugo, meu companheiro, meu melhor amigo, por acreditar em mim mais do que eu alguma vez acreditei em mim mesma, por me dar força sempre que ela se esgota.

À D. Anabela, Sr. Paulo, Sara, Ricardo e Rodriguinho... por me receberem como filha, irmã e tia, por sempre me terem acolhido como se da minha própria família se tratasse.

À minha Beluga, à minha Mia e à minha Estrelinha... por me darem as ferradelas e as lambidelas que eu mais adoro...

**Finalmente agradeço a quem, com saudade, dedico a conclusão desta etapa... ao meu avô, meu segundo pai... onde quer que estejas, estarás sempre comigo...**

# LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Anticorpos

AFB<sub>1</sub> – Aflatoxina B<sub>1</sub>

AGV – Ácidos gordos voláteis

AFM<sub>1</sub> – Aflatoxina M<sub>1</sub>

BEN – Balanço energético negativo

CA – Carvão activado

CE – Comissão Europeia

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

DAS – Diacetoxiscirpenol

DIM – Dias em lactação

DOM-1 – 12,13-depoxidesoxinivalenol

DON – Desoxinivalenol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

FB1 – Fumonisin B<sub>1</sub>

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HACCP – Análise dos perigos e pontos críticos de controlo

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MS – Matéria seca

OTA – Ocratoxina A

P<sub>10</sub> – Décimo percentil

P<sub>90</sub> – Nonagésimo percentil

ppb – Partes por bilião

ppm – Partes por milhão

PPT – Proteínas plasmáticas totais

SNC – Sistema nervoso central

TMR – Alimento completo

UE – União Europeia

UFC – Unidades formadoras de colónias

ZEA – Zearalenona

# ÍNDICE

Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Agradecimentos .....	v
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de Quadros .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Apresentação .....	xi
1. Revisão Bibliográfica .....	1
1.1.Crescimento fúngico.....	1
1.1.1.Condições de crescimento.....	2
1.1.2.Produção de micotoxinas.....	2
1.2.Micotoxinas na dieta de animais ruminantes .....	3
1.2.1.Planta em verde.....	3
1.2.2.Forragens conservadas .....	4
1.2.3.Alimentos concentrados.....	5
1.3.Prevalência e legislação .....	6
1.4.Impacto na saúde animal.....	7
1.5.Impacto económico .....	9
1.6.Controlo.....	9
2.Trabalho experimental .....	11
2.1.Objetivos .....	11
2.2.Material e Métodos .....	11
2.2.1.Análise de manejo .....	11
2.2.2.Efeito do uso de adsorvente .....	14
2.2.3.Análise estatística .....	15
2.3.Resultados e discussão.....	16
2.3.1.Análise de Maneio – Programa MIKO® .....	16
2.3.2.Análise de fatores .....	19
2.3.3.Efeito do uso de adsorvente .....	21
3.Conclusão.....	28
4.Bibliografia.....	30
5.Anexos.....	34



# LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais micotoxinas e efeitos decorrentes da sua ingestão, em bovinos. ....	10
Quadro 2 – Caracterização das explorações estudadas relativamente aos animais em produção.....	20
Quadro 3 – Caracterização das explorações estudadas relativamente à produção de leite. ....	21
Quadro 4 – Efeito do uso de adsorvente, da prática de vacinação, da presença de robot de ordenha e da utilização de programas de qualidade de leite na produção de leite, na saúde dos animais e no manejo geral da exploração. ....	25
Quadro 5 – Fatores retidos segundo o critério Mineigen na análise de fatores. ....	26
Quadro 6 – Resultados da análise de micotoxinas por LC-MS (Programa Miko37+ da Alltech®) de alimento completo. ....	31
Quadro 7 – Efeito da inclusão de 15 g/vaca/dia de Mycosorb®, na dieta, nos parâmetros hematológicos de vacas leiteiras. ....	34
Quadro 8 – Amostras recolhidas pela Alltech® Portugal em 2012, no concelho de Vila de Conde, para pesquisa de micotoxinas. ....	43
Quadro 9 – Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 referente aos teores de contaminantes presentes nos géneros alimentícios. ....	43
Quadro 10 – Regulamento (UE) Nº 574/2011 DA Comissão de 16 de Junho de 2011 referente aos teores de Aflatoxina B1 nos alimentos para animais. ....	43
Quadro 11 – Recomendação da Comissão de 17 de Agosto de 2006 (2006/576/CE). ....	44
Quadro 12 – Métodos de análise e de deteção de micotoxinas. ....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre os fatores 1 e 2. ....	27
Figura 2 – Relação entre os fatores 2 e 3. ....	27
Figura 3 – Relação entre os fatores 1 e 3. ....	28
Figura 4 – Produção de leite diária, na exploração estudada, nos meses de março e abril .....	29

# APRESENTAÇÃO

A necessidade crescente de estratégias eficientes de produção de alimentos e a ciência necessária para que as mesmas sejam empregues, torna a Nutrição Animal numa ferramenta imprescindível na realidade atual. Foi nesse sentido que acreditei ser importante para a minha formação a expansão de conhecimentos nesta área, uma vez que novos desafios se impõem face a uma população em crescimento exponencial num planeta com recursos limitados. Após um breve período de indecisão, entre dois mundos que me fascinam, a escolha pelo estágio na área da produção e nutrição de bovinos de leite surgiu-me como óbvia pelos motivos supracitados.

A Cooperativa Agrícola de Vila do Conde (CAVC) e a Alltech® Portugal foram, por esse motivo, as entidades de eleição para completar a minha formação em Medicina Veterinária. A primeira porque acompanha a grande parte dos produtores de leite de uma zona importantíssima na produção leiteira nacional. Integrado na Bacia Leiteira Primária de Entre-Douro e Minho, o Concelho de Vila do Conde é considerado uma das principais áreas de produção de leite em Portugal. A segunda pelo facto de ser uma empresa líder de mercado na área da nutrição e saúde animal, com uma preocupação constante na educação, formação e inovação.

Durante 16 semanas tive a oportunidade de acompanhar o trabalho diário do corpo técnico da Subsecção de Nutrição Animal da CAVC, sob a orientação da Eng.<sup>a</sup> Ana Gomes e, também, sob a supervisão do Eng. André Lopes e da Eng.<sup>a</sup> Isabel Ramos. Pude, ainda, acompanhar a Dr.<sup>a</sup> Isabel Santos e a Dr.<sup>a</sup> Joana Correia no laboratório de Qualidade de Leite e de observar o serviço prestado aos associados da CAVC nesta área. Destaco, entre outras, as seguintes atividades:

- Visitas de rotina às explorações acompanhada pelos técnicos de nutrição animal da CAVC, de forma a verificar se o manejo alimentar se encontrava ajustado e se novas alterações seriam necessárias;
- Acompanhamento durante as recolhas de amostras de silagens de milho e de erva para análise química e posterior ajuste da mistura de matérias-primas exclusiva da exploração;
- Observação do manejo e das condições gerais de uma exploração. Saber avaliar explorações problemáticas e reconhecer problemas de forma a construir a solução para uma determinada situação;
- Acompanhamento da atividade de formulação de regimes alimentares para bovinos de leite, através do uso de programas informáticos;
- Reconhecimento da importância da relação comercial entre técnicos e clientes, da capacidade de solucionar problemas atuais e de saber fornecer alternativas e soluções;

- Acompanhamento das atividades realizadas no laboratório de qualidade do leite. Inoculação de amostras de leite de animais com mastite;
- Acompanhamento do serviço de clínica de reprodução, com o Dr. Miguel Costa;
- Tive, ainda, a oportunidade de observar e acompanhar o estudo desenvolvido na CAVC no âmbito da “Avaliação económica do manejo reprodutivo de uma exploração leiteira”, de Dr.<sup>a</sup> Isabel Santos, Dr. Pedro Reis, Dr.<sup>a</sup> Joana Correia, Eng.<sup>a</sup> Ana Gomes, Eng.<sup>a</sup> Isabel Ramos e Eng. André Lopes.

Todas estas atividades permitiram que adquirisse novos conhecimentos teóricos e práticos, possibilitando também a integração destes com os conhecimentos pré-adquiridos ao longo da minha formação.

Mais do que isto, tive ainda a oportunidade de aprender a trabalhar em contexto empresarial, de estabelecer relações interpessoais profissionais e de saber lidar com questões que, diariamente, se poderão colocar numa empresa.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. CRESCIMENTO FÚNGICO

As micotoxinas são metabolitos secundários resultantes da actividade fúngica, que exercem efeitos indesejáveis e geralmente graves em seres humanos e animais (Jouany *et al.* 2009). As de maior importância para a saúde pública e animal, como também para a economia agrícola, são produzidas por fungos pertencentes aos géneros *Aspergillus* (Aflatoxina e Ocratoxina A), *Penicillium* (Ocratoxina A, Patulina), *Fusarium* (Zearalenona, Fumonisinhas, Tricotecenos) e, ainda, *Neotyphodium* e *Claviceps* (alcaloides ergot; Jouany *et al.* 2009; Fink-Gremmels 2010; Santin 2010).

O crescimento fúngico é um fenómeno que inclui uma fase unicelular, microscópica, uma fase de desenvolvimento de estruturas filamentosas (hifas) que formam micélios macroscópicos e uma fase de produção de esporos que usualmente confere à colónia a sua coloração característica (Jouany & Diaz 2010; Santin 2010). A produção de esporos surge como fator determinante na perpetuação de determinadas espécies de fungos, uma vez que estas estruturas possuem viabilidade no solo durante meses. Isto significa que, até que surjam condições ambientais adequadas ao seu desenvolvimento, permanecem numa fase de desenvolvimento estacionária (Santin 2010).

De acordo com as necessidades específicas de cada espécie consideram-se dois grupos principais de fungos: os patogénicos ou “de campo” e os saprófitas, ou “de armazenamento” (Santin 2010). Os primeiros, representados maioritariamente por *Fusarium sp.*, necessitam de um teor de humidade maior e, geralmente, infetam a planta aquando do seu crescimento (Santin 2010). No entanto, existem condições que diminuem a capacidade de resistência das culturas e favorecem a infeção, tais como *stress* térmico, teores de humidade extremos, danos por insectos e presença de outros fitopatogénicos. Estes fatores, ao aumentarem a probabilidade de infeção fúngica, aumentam, conseqüentemente, o risco de contaminação com micotoxinas (Cheli *et al.* 2013). Os segundos, nos quais se incluem *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, são, maioritariamente, fungos oportunistas que se desenvolvem posteriormente à colheita (aquando do transporte, armazenamento, processamento e distribuição aos animais) se condições como temperatura, teores de oxigénio e de dióxido de carbono, humidade e presença de insectos ou roedores se conjugarem de forma a tornar o meio propício ao seu desenvolvimento (Jouany *et al.* 2009; Santin 2010). Deve ressaltar-se, no entanto, que o crescimento fúngico depende grandemente de fatores ambientais, não significando, portanto, que fungos tipicamente patogénicos não cresçam aquando do armazenamento, e que fungos maioritariamente saprófitas não possuam capacidade de colonizar plantas em crescimento (Santin 2010).

### 1.1.1. Condições de crescimento

A temperatura, o teor em humidade, a disponibilidade de água (*aw*), o teor em oxigénio e a presença de insetos e roedores são alguns dos fatores que condicionam a contaminação e crescimento fúngicos (Jouany *et al.* 2009).

A presença de oxigénio é um requisito absoluto, sendo que as necessidades mínimas da maioria das espécies se encontram na ordem dos 1 a 2% (Santin 2010). O intervalo de temperaturas ideal para a maioria das espécies de fungos envolvidas na produção de micotoxinas ronda os 10 a 30 °C, havendo, contudo, diferenças nas necessidades específicas de cada espécie (Jouany *et al.* 2009). O teor em humidade, cujas necessidades usualmente rondam os 13 a 21%, e a disponibilidade de água são também fatores essenciais ao crescimento fúngico, existindo, porém, uma maior variabilidade das necessidades de cada fungo (Santin 2010). Assim, o *Aspergillus* cresce tipicamente em regiões de clima quente e seco, ao contrário do *Fusarium*, cujas temperaturas ótimas de crescimento e necessidades de humidade relativa se enquadram geralmente nas regiões de clima temperado, com temperaturas mais baixas e maior humidade relativa (Santin 2010). Já o *Penicillium sp.* possui uma maior variabilidade de condições necessárias ao seu crescimento, dependendo da espécie em causa. No entanto, condições como baixa temperatura, elevada humidade relativa e pH baixo são, geralmente, as ideais (Diaz *et al.* 2011).

A presença de insetos e de roedores é outro dos fatores adjuvantes do crescimento fúngico, uma vez que estes se afiguram como vetores de esporos. O dano que estes causam no pericarpo dos grãos de cereais facilita ainda o acesso ao endosperma, nutricionalmente mais rico, favorecendo a colonização e contaminação fúngicas (Santin 2010).

### 1.1.2. Produção de micotoxinas

A produção de micotoxinas ocorre durante a fase final de crescimento exponencial fúngico, sendo por isso considerada como metabolismo secundário, independente do metabolismo essencial ao crescimento (metabolismo primário; Jouany *et al.* 2009; Santin 2010). Habitualmente, esta atividade surge face a fatores ambientais de *stress* para os fungos, como temperaturas extremas, teores de humidade excessivamente elevados ou diminuídos e presença de substâncias fungicidas (Jouany *et al.* 2009; Santin 2010).

Existem centenas de fungos capazes de produzir micotoxinas e uma ainda maior diversidade de micotoxinas produzidas (Akande *et al.* 2006; Harris & Staples 2008). Dado que uma só estirpe fúngica é capaz de produzir várias toxinas, e que uma toxina poderá ser produzida por espécies diferentes de fungos, a probabilidade de contaminações múltiplas e a multiplicidade de interações entre as micotoxinas presentes numa mesma matriz alimentar (aditivas e sinérgicas) revelam-se bastante elevadas (Jouany *et al.* 2009). Sabe-se, ainda,

que a contaminação de um determinado alimento por fungos não implica que estejam presentes micotoxinas, visto que nem todas as espécies as produzem. Do mesmo modo, a aparente ausência de contaminação fúngica não significa que o alimento esteja livre de micotoxinas, uma vez que o fungo poderá ter morrido depois de as ter produzido (Jouany & Diaz 2010). Tais factos revestem o presente tema de uma ainda maior complexidade.

## **1.2. MICOTOXINAS NA DIETA DE ANIMAIS RUMINANTES**

A complexidade da dieta dos bovinos de produção de leite das bacias leiteiras mais importantes do país (Entre-Douro e Minho, Beira Litoral e Açores) e a multiplicidade de ingredientes aí presentes, que poderá incluir forragens conservadas, alimentos concentrados e pastagens, eleva significativamente o risco de presença de micotoxinas. Por outro lado, a probabilidade de toxicidade aguda poderá diminuir nestes casos, uma vez que um alimento eventualmente contaminado acaba por ser diluído na dieta final (Jouany & Diaz 2010).

### **1.2.1. Planta em verde**

O risco de micotoxicose por ingestão de planta em verde assume particular interesse em sistemas de produção à base de pastoreio, como na região dos Açores. Aqui, o manejo alimentar dos bovinos de leite caracteriza-se por ser semi-intensivo, sendo permitido aos animais o pastoreio anual e complementando a dieta com forragens conservadas e alimentos concentrados quando necessário (Pinto 2010).

Na região do Entre-Douro e Minho, o pastoreio não assume uma importância significativa na dieta da vaca leiteira. No entanto, a exposição a micotoxinas poderá ser uma realidade nas épocas do ano em que é permitido ao animal o acesso a pastagens ou aquando do uso de forragens verdes distribuídas na manjedoura (Gomes A, Comunicação Pessoal, 2013).

A produção de micotoxinas em pastagens poderá ocorrer aquando da infeção por fungos patogénicos ou endófitos. Os primeiros, já referidos e no qual se inclui *Fusarium sp.* e *Rhizoctonia leguminicola*, possuem capacidade de infetar a planta, exercendo nela efeitos negativos. Os segundos, pelo contrário, estabelecem uma relação de simbiose com o hospedeiro, aumentando a sua resistência a patógenos e a condições ambientais desfavoráveis (Fink-Gremmels 2010). Como exemplo destes pode citar-se *Neotyphodium sp.*, endófito de forrageiras gramíneas como o azevém (*Lolium sp.*), a festuca (*Festuca sp.*) e a erva-fina (*Agrostis sp.*). As pastagens de azevém perene (*Lolium perenne*) e de festuca alta (*Festuca arundinacea*) são as mais frequentemente infetadas por *Neotyphodium sp.*. No entanto, outras gramíneas também o poderão ser, nomeadamente a *Festuca longifolia*, *Festuca duriuscula*, *Festuca rubra litoralis*, *Festuca rubra commutata*, *Festuca rubra rubra*,

*Festuca ovina* e diversas espécies de *Agrostis*. (Fink-Gremmels 2010; Freixial & Barros 2012) Esta espécie fúngica produz alcaloides ergot, de entre os quais se destaca a ergovalina (geralmente em festuca alta) e alcaloides tipo indóis diterpeno, sendo que destes o lolitrem B (geralmente produzido em azevém perene) é o mais relevante (Smith & Korosteleva 2010).

O *Rhizoctonia leguminicola* é um fungo patogénico comumente associado a leguminosas, principalmente trevo-violeta (*Trifolium pratense*). Desta associação poderá resultar a produção de eslaframina. A swainsonina é produzida também pela infeção de culturas de *Swainsona canescens* pelo fungo acima descrito. Foi inicialmente considerada como uma fitotoxina produzida por espécies de *Astragalus sp.* e *Oxytropis sp.*, havendo, no entanto, quem a refira como resultante da infeção de leguminosas por um fungo endófito (*Embellisia sp.*) e não pela infeção por *R. leguminicola* (Fink-Gremmels 2010).

### 1.2.2. Forragens conservadas

As forragens conservadas poderão preservar algumas das micotoxinas produzidas previamente à colheita e possuir flora típica de armazenamento como *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* (Fink-Gremmels 2010). A eventual contaminação das silagens é de extrema importância, uma vez que constituem a base da alimentação da vaca leiteira na região do Entre-Douro e Minho e Beira Litoral (Cabrita, 2003). Com efeito, num estudo realizado por Driehuis *et al.* (2008), no qual foram medidos os níveis de micotoxinas ingeridos por vacas leiteiras, mostrou-se que poderá existir uma contribuição significativamente maior da silagem nos níveis de desoxinivalenol (DON) e de zearalenona (ZEA) ingeridos pelos animais (3,5 e 2,9 vezes maior respetivamente) comparativamente ao alimento composto (Cheli *et al.* 2013), o que poderá ser explicado pela maior proporção que a silagem representa na dieta total da vaca leiteira. As condições do próprio processo de ensilagem podem influenciar a sua contaminação. Dada a importância do maneio do processo, é expectável uma elevada variabilidade de grau de contaminação das silagens, sendo que, se as condições de anaerobiose não forem atingidas ou mantidas, podem proliferar *Clostridium sp.*, leveduras e fungos (Fink-Gremmels 2010; Cheli *et al.* 2013).

Os fungos mais prevalentes em silagens são o *Penicillium roqueforti*, o *Aspergillus fumigatus* e o *Aspergillus flavus*, o primeiro em regiões de clima temperado e os dois últimos em regiões tropicais e subtropicais (Cheli *et al.* 2013). Em silagens de erva é, também, comum a presença de *Monascus sp.* (Fink-Gremmels 2010). Estas espécies poderão ser tolerantes à privação parcial ou total de oxigénio e até mesmo à presença de ácidos orgânicos (particularmente *Penicillium roqueforti*), sendo capazes de sobreviver durante a fermentação e de proliferar após a abertura do silo ou em caso de anaerobiose incompleta por má prática de ensilagem (Jouany *et al.* 2009). Já *Fusarium sp.* é, geralmente, inibido com boas práticas de



ensilagem, ou seja, em anaerobiose e a baixo pH, sendo a produção de fusariotoxinas também inibida nestas condições.

De acordo com a sensibilidade das micotoxinas ao pH resultante das fermentações anaeróbias durante a ensilagem, poderá existir algum grau de metabolização e degradação (Cheli *et al.* 2013). No entanto, deve ter-se sempre em consideração que estes processos poderão ser incompletos e que se as micotoxinas foram produzidas antes da colheita, podem manter-se na silagem (Fink-Gremmels 2010; Cheli *et al.* 2013).

Relativamente aos fenos, o teor e tipo de micotoxinas neles presentes dependem do grau de contaminação das forragens que lhes deram origem, mas também do tratamento e armazenamento. O teor em humidade do ar aquando da colheita e durante o armazenamento é extremamente importante e, se inadequado, influi positivamente na proliferação fúngica (Jouany *et al.* 2009). Como exemplo podem citar-se o *Alternaria sp.* e o *Aspergillus fumigatus*, que crescem tipicamente em feno mal conservado (Fink-Gremmels 2010). No mesmo sentido, caso o manejo das forragens seja adequado, o próprio tempo de armazenamento poderá ajudar à diminuição da concentração de algumas micotoxinas, como acontece no feno de azevém perene acima citado. Embora possa conter alguma da concentração de lolitrem B produzida previamente à colheita, ao fim de três meses de armazenamento apropriado os níveis deste composto diminuem para valores insignificantes (Fink-Gremmels 2010).

### **1.2.3. Alimentos concentrados**

Os cereais e os subprodutos da indústria alimentar são os que apresentam um maior risco de exposição a micotoxinas (Jouany *et al.* 2009), visto que o manejo e a forma física dos alimentos para animais influem significativamente na sua suscetibilidade à contaminação. O manejo é, por isso, extraordinariamente importante na prevenção da proliferação fúngica, sendo recomendável uma boa circulação de ar no local de armazenamento, de forma a reduzir o teor em humidade dos cereais para menos de 15% nas primeiras 48 h após a colheita (Jouany *et al.* 2009). De notar que os que se apresentam sob a forma farinada apresentam um particular risco de proliferação de fungos, uma vez que carecem da estrutura de proteção externa do grão (pericarpo) (Jouany *et al.* 2009). No mesmo sentido, os subprodutos da transformação de cereais, frequentemente utilizados como alimentos para animais, poderão possuir um maior teor de micotoxinas, uma vez que estas se localizam maioritariamente na camada externa dos grãos (Jouany 2007). Assim, os subprodutos de destilarias, como os drêches, poderão conter até três vezes mais micotoxinas do que os grãos de cereais, uma vez que estas permanecem concentradas no resíduo após o processo de filtração (Diaz *et al.* 2011).

### 1.3. PREVALÊNCIA E LEGISLAÇÃO

A globalização e as políticas económicas que dela resultam aumentam significativamente a transação de matérias-primas a nível mundial. Com esta nova realidade surgem novos riscos que implicam uma maior vigilância e a existência de sistemas de alerta, particularmente no que respeita à comercialização de bens alimentares.

Num estudo realizado por Binder *et al.* (2007), cujo objetivo foi o de registar a ocorrência mundial de micotoxinas em matérias-primas e alimentos para animais recolhidos em explorações e em empresas de produção de alimentos compostos, obtiveram-se resultados surpreendentes. Com efeito, o estudo refere que mais de metade (52%) das amostras recolhidas na Europa se encontravam contaminadas por micotoxinas (sendo o DON, a ZEN e a toxina T-2 os mais prevalentes) e cerca de um terço das amostras recolhidas em regiões da Ásia e Oceânia revelaram-se positivas (das quais DON, ZEN e fumonisinas foram as mais frequentemente encontradas). Na região Mediterrânica, na qual se incluía Portugal, o mesmo estudo refere a existência de DON em 52%, ZEN em 23%, toxina T-2 em 19%, OTA em 33%, AFB<sub>1</sub> em 28% e fumonisinas em 73% das amostras.

Na União Europeia foram recolhidos dados pela Alltech® que permitiram verificar a existência de contaminação por DON em 73% dos alimentos para animais analisados: fumonisinas em 41%, toxinas de *Penicillium* em 23%, toxinas T-2 e HT-2 em 20%, ZEN em 18%, aflatoxinas em 12%, toxinas ergot em 10% e ocratoxinas em 4% das amostras. Num outro estudo realizado pela mesma entidade, no concelho de Vila do Conde, no qual foram analisados alimentos para bovinos de leite (62,5% da amostra era constituída por silagem de milho, 25% por silagem de erva e 12,5% por alimento composto) observou-se uma elevada contaminação por micotoxinas, tendo sido detetadas fumonisinas em todas as amostras, DON em 50% da amostragem, toxina T-2, toxina HT-2, patulina e gliotoxina em 25% das amostras, e AFB<sub>1</sub> em 13% (Quadro 8, Anexo; Caramona P, Comunicação Pessoal, 2013).

Recentemente, surgiu uma crise de AFM<sub>1</sub> na região dos Balcãs que resultou de seca extrema na época de colheita de 2012. Em fevereiro/março de 2013 foi confirmada a contaminação nacional de milho e de laticínios na Roménia, Sérbia, Croácia e também noutros países Europeus. As trocas comerciais foram profundamente condicionadas. Mesmo assim, na Alemanha e Holanda foram detetados alimentos para animais previamente importados contaminados com AFB<sub>1</sub>. Na Sérbia, os limites máximos aceitáveis de AFM<sub>1</sub> para o leite foram temporariamente elevados de 0,05 ppb para 0,5 ppb, o que resultou numa agitação política nacional (Caramona P, Comunicação Pessoal, 2013).

A informação exposta mostra claramente a existência de uma elevada incidência de micotoxinas nos alimentos para animais, não só em países terceiros, mas, também, na União Europeia e até mesmo em Portugal. Nesse sentido, deverá existir um compromisso entre o que

é tolerável para a saúde pública e as consequências económicas que resultam dos limites considerados “seguros”, uma vez que a eliminação do perigo é impossível de alcançar (Galvano *et al.* 2010). Em Anexo apresenta-se a legislação comunitária de controlo de micotoxinas a nível Europeu, nos Quadros 9, 10 e 11.

#### **1.4. IMPACTO NA SAÚDE ANIMAL**

É, geralmente, aceite que os animais ruminantes apresentam maior resistência a micotoxicoses devido à capacidade de eliminação de microrganismos patogénicos e bioconversão de substâncias tóxicas da população microbiana do retículo-rúmen (Jouany *et al.* 2009; Jouany & Diaz 2010). Porém, está descrito por Fink-Gremmels (2008) que a capacidade de metabolização ruminal é saturável e dependente de alterações da dieta e de patologias metabólicas (Cheli *et al.* 2013). Por outro lado, torna-se perceptível que a existência de micotoxinas com propriedades antibacterianas poderá, em alguns casos, comprometer a digestão e a capacidade de metabolização, uma vez que provocam desbiose ruminal. Do mesmo modo, a metabolização ruminal de determinadas micotoxinas não se traduz sempre na inocuidade dos metabolitos formados, havendo casos em que estes possuem toxicidade semelhante ou até mesmo superior à molécula que lhes deu origem (Smith & Korosteleva 2010).

A severidade da micotoxicose dependerá do tipo de composto envolvido, da dose a que o indivíduo está exposto, do tempo de exposição, da interação entre micotoxinas e outras substâncias e da suscetibilidade individual (Santos & Fink-Gremmels 2010). Apesar de estarem descritos casos de toxicidade aguda, o mais frequente em bovinos leiteiros são os quadros crónicos, nos quais surgem sinais como aumentos de patologias infecciosas devido a imunodepressão, quebras de produção, diminuição da ingestão, diminuição do ganho médio de peso e agravamento dos índices reprodutivos, como se pode constatar pela análise do Quadro 1 (Smith & Korosteleva 2010).

Cabe aqui relembrar o efeito que o *stress* exerce no estado imunitário do animal, podendo agravar o efeito imunodepressor que as micotoxinas possuem. Assim, vacas de alta produção, sujeitas a um maior *stress* produtivo, apresentam geralmente uma maior suscetibilidade aos efeitos crónicos da exposição a micotoxinas (Smith & Korosteleva 2010).

#### **1.5. IMPACTO ECONÓMICO**

O impacto económico negativo da contaminação fúngica reside nas perdas de produção agrícola, quer por diminuição da qualidade e valor nutricional de géneros alimentícios e de alimentos para animais, como também pelas quebras de produção animal.

**Quadro 1 – Principais micotoxinas e efeitos decorrentes da sua ingestão, em bovinos.**

Micotoxina	Fungos produtores	Efeitos em bovinos
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	Carcinogénicas, hepatotóxicas, imunotóxicas, teratogénicas. Quadros agudos: lesão hepática, prostração, anorexia, hemorragias, edemas, congestão e esteatose hepática. Quadros crónicos: quebras de ingestão e de produção, agravamento de índices reprodutivos, degeneração e neoplasia hepáticas, aumento de patologias infecciosas (Bennet & Klich 2003; Akande et al. 2006; Jouany et al. 2009; Jouany & Diaz 2010; Santin 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Zearalenona (ZEA)	<i>Fusarium sp.</i> ( <i>F.graminearum</i> )	Estrogénica Quebras de produção, de ganho médio diário, diarreias, depressão do sistema imunitário, agravamento geral dos índices reprodutivos – anestros, diminuição das taxas de concepção, aumento de mortes embrionárias e de abortos, vaginites, metrites, hipertrofia genital e mamária em fêmeas pré-púberes, feminização de machos (Rossi et al. 2009; Jouany & Diaz 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Desoxinivalenol (DON)	<i>Fusarium sp.</i> ( <i>F.graminearum</i> )	Imunotóxico, inibidor da síntese proteica. Quebras de ingestão e de produção, diminuição da gordura do leite, aumento de contagem de células somáticas, alterações metabólicas e imunodepressão (Akande et al. 2006; Jouany et al. 2009; Jouany & Diaz 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Fumonisinias (B1, B2, B3)	<i>F.verticillioides</i> <i>F.proliferatum</i>	Carcinogénicas, neurotóxicas, imunotóxicas, inibidoras da biossíntese de esfingolípidos e promotoras de peroxidação lipídica. Quebras de ingestão e de produção, lesão hepática (Jouany & Diaz 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Ocratoxina A (OTA)	<i>P.verrucosum</i> <i>A.ochraceus</i>	Nefrotóxica Efeitos não descritos em bovinos de leite (Jouany & Diaz 2010; Santin 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Toxina T2	<i>Fusarium sp. (F.tricinctum)</i>	Imunotóxico, inibidor da síntese proteica, promotora de peroxidação lipídica. Anorexia, perda de condição corporal, quebra de produção, diarreia, gastroenterite hemorrágica, necrose e ulceração do tracto gastrointestinal (GI), imunodepressão, morte (Wannemacher & Wiener 1997; Akande et al. 2006; Jouany & Diaz 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Ácido Fusárico	<i>Fusarium sp.</i>	Efeito sinérgico com outras micotoxinas, antibacteriano. Inibição de <i>Ruminococcus albus</i> e <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> , desbiose ruminal (Smith & Korosteleva 2010).
Ergovalina	<i>Neotyphodium sp.</i>	Agonista dos receptores de dopamina. (Fink-Gremmels 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Lolitre B	<i>Neotyphodium lolii</i>	Interação com vias do receptor ácido gama-aminobutírico (GABA) e com aminoácidos excitatórios no sistema nervoso central (Fink-Gremmels 2010).
Patulina	<i>P.expansum</i> <i>A.clavatus</i>	Antibacteriana, imunotóxica, neurotóxica, toxicidade GI e a nível do SNC. Desbiose ruminal, síndromes hemorrágicas e sintomatologia nervosa: ataxia, mioclonias, parésia, decúbito permanente, morte (Fink-Gremmels 2010; Jouany & Diaz 2010; Smith & Korosteleva 2010).
Ácido Penicílico Ácido Micofenólico	<i>P.roqueforti</i>	Antibacterianos Desbiose ruminal, ruminites (Fink-Gremmels 2010).

As perdas produtivas manifestam-se, geralmente, de forma quase silenciosa, levando, por isso, a consequências económicas nem sempre óbvias para o produtor. Uma vez que a palatibilidade e o valor nutritivo dos alimentos contaminados por fungos se encontram frequentemente diminuídos, poderão surgir quebras de ingestão e de produção, mesmo na ausência de micotoxinas (Cheli *et al.* 2013). Este fenómeno ocorre devido à atividade metabólica fúngica que, sendo aeróbia, traduz-se em reduções dos teores em hidratos de carbono e de gordura como também em diminuições dos níveis de aminoácidos essenciais (Santin 2010).

## 1.6. CONTROLO

O controlo de micotoxinas deve, idealmente, incluir um programa de gestão que permita efetuar uma análise de risco, identificar pontos críticos de controlo e estabelecer medidas corretivas que possibilitem a redução precoce do risco de contaminação fúngica. Deverão existir, ainda, técnicas analíticas que permitam o controlo de alimentos suspeitos e estratégias que diminuam a biodisponibilidade das micotoxinas no tubo digestivo dos animais quando os passos anteriores se revelam infrutíferos (Caramona P, Comunicação Pessoal, 2013).

Existem várias estratégias de prevenção de contaminação por fungos e micotoxinas, nomeadamente as relativas ao manejo e boas práticas agrícolas (e.g., preparação do solo, rotação de culturas, época de cultivo, manipulação genética), controlos químico, biológico e de pragas, época e condições de colheita, de armazenamento e de ensilagem, tratamentos físicos e químicos, utilização de agentes biotransformadores e adsorventes de micotoxinas. Destes últimos, faz-se, de seguida, uma breve referência aos  $\beta$ -D-Glucanos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (MYCOSORB®).

No Quadro 12, em anexo, descrevem-se, sumariamente, alguns procedimentos de análise e deteção.

- **$\beta$ -D-GLUCANOS DE PAREDE CELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (MYCOSORB®)**

Os adsorventes à base de parede celular de leveduras começaram a ser considerados uma possível alternativa às desvantagens apresentadas pelos anteriormente citados após um estudo de Stanley *et al.* (1993) com culturas puras de *S. cerevisiae* em aves (citado por Diaz & Smith 2010). Investigações realizadas *in vitro* por Devegowda *et al.* (1998) e por Dawson *et al.* (2001), posteriormente, permitiram a descoberta dos componentes responsáveis pela adsorção de micotoxinas, o que possibilitou a comercialização de preparações específicas de parede celular de leveduras, disponíveis no mercado com a referência Mycosorb® (Alltech®) (Jouany 2007; Diaz & Smith 2010).

A parede celular de *S. cerevisiae* é constituída essencialmente por proteínas e hidratos de carbono, sendo que estes últimos são compostos por glucanos (polissacarídeos constituídos por unidades de glicose) e mananos (polissacarídeos constituídos por unidades de manose) em igual proporção, e também N-acetilglucosamina (Avantaggiato *et al.* 2009). As interações estabelecidas entre o Mycosorb® e as micotoxinas foram descritas há cerca de uma década por Yiannikouris *et al.* (2004), onde se constatou que são as frações de  $\beta$ -D-glucanos da parede celular de *S. cerevisiae* as responsáveis pelo processo (Jouany 2007). A capacidade de adsorção deve-se, portanto, à sua estrutura conformacional que permite a formação de ligações não-covalentes (ligações de hidrogénio e forças de *Van der Waals*) entre os grupos hidroxilo presentes e os grupos hidroxilo, cetona e lactona das micotoxinas (Jouany 2007). Diversos estudos realizados com ZEA, incluindo ressonância magnética nuclear e mecânica molecular, clarificam esta interação entre adsorvente e micotoxina em que, além das ligações estabelecidas, se verificou uma complementaridade geométrica que favorece a estabilização do complexo (Diaz & Smith 2010). Nesse sentido, torna-se importante realçar o aumento de afinidade resultante das alterações conformacionais que surgem por ligação de uma primeira molécula, referido como “cooperatividade”. Isto permite explicar o traçado sigmoide obtido no processo de adsorção de micotoxinas por Mycosorb®, reproduzido por uma função logística. Apesar de a adsorção ser inicialmente lenta, esta aumenta de forma exponencial à medida que aumentam o número de complexos adsorvente-micotoxina, até atingir um ponto de saturação (Avantaggiato *et al.* 2009).

Confirma-se, portanto, que é graças à complexidade estrutural da parede celular de leveduras e às propriedades físico-químicas dela resultantes, que a adsorção de diferentes micotoxinas se torna possível e estável ao longo do tubo digestivo (Diaz & Smith 2010). Com efeito, Devegowda *et al.* (1998 citado por Jouany *et al.* 2009) testaram *in vitro* a capacidade de adsorção de Mycosorb®, com várias micotoxinas, obtendo 85% de adsorção para aflatoxina, 67% para ZEN, 67% para fumonisinas, 33% para toxina T-2, entre 12 a 18% para OTA, DON, DAS e citrinina e 8% para nivalenol e fusariotoxina X.

Os estudos efetuados em animais são maioritariamente em aves e suínos alimentados com dietas contaminadas por diferentes micotoxinas com inclusão de adsorventes. Obtiveram-se aumentos de ingestão e de ganho de peso médio e melhorias nos parâmetros bioquímicos e hematológicos (Diaz & Smith 2010). Estes dados poderão não só resultar da capacidade de adsorção dos compostos à base de parede celular de leveduras, mas, também, da capacidade que os  $\beta$ -D-glucanos de *S. cerevisiae* possuem em estimular o sistema imunitário, o que aumenta a capacidade de resposta a patógenos (Avantaggiato *et al.* 2009). Em bovinos de leite os estudos incidem essencialmente na taxa de excreção de AFM<sub>1</sub>, sendo que, enquanto Diaz *et al.* (2004) registaram uma diminuição da concentração de AFM<sub>1</sub> no leite de 58,5% com o uso de 0,05% de Mycosorb®, Kutz *et al.* (2009) obtiveram uma diminuição da concentração

de AFM<sub>1</sub> de apenas 4%, com uma dose cerca de dez vezes superior, 0,56% da dieta (estudos citados por Avantaggiato *et al.* 2009).

## **2. TRABALHO EXPERIMENTAL**

### **2.1. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve, como principais objetivos, a observação e análise do manejo praticado em explorações comerciais de bovinos de leite da região do Entre-Douro e Minho, a identificação de explorações com eventual risco de exposição a micotoxinas, a deteção dos pontos críticos aí existentes e o estudo dos procedimentos a melhorar, na rotina de trabalho de uma exploração crítica, de forma a prevenir o crescimento de fungos e a eventual contaminação da dieta dos animais. Pretendeu-se avaliar o impacto da presença de micotoxinas em parâmetros como saúde animal, produtividade e índices reprodutivos e, também, a relação entre estes e a inclusão de adsorventes na dieta. Por fim, numa “exploração-problema” foi analisado o efeito do uso de adsorvente à base de parede celular de leveduras (Mycosorb<sup>®</sup>) em parâmetros hematológicos.

### **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.2.1. Análise de manejo**

Durante 10 semanas, entre os dias 28 de janeiro e 5 de abril de 2013, foram recolhidos dados em 30 explorações comerciais de bovinos de leite da região do Entre-Douro e Minho, 29 das quais no concelho de Vila do Conde e uma no concelho da Maia. Com o auxílio do programa MIKO<sup>®</sup> da Alltech<sup>®</sup>, baseado no sistema HACCP, foram obtidos dados gerais da exploração junto do responsável pela mesma e, também, verificadas as condições de manejo e gestão alimentar. O programa permite, a pedido do produtor, avaliar quantitativamente a sua exploração através da recolha de informação e de um ato de verificação que possibilite a deteção de pontos críticos e a implementação de medidas de controlo. Para o efeito, são considerados a incidência de doenças infecciosas, os índices de fertilidade e o manejo das forragens e dos alimentos concentrados e compostos, desde a colheita até à ensilagem, bem como ao armazenamento e distribuição aos animais.

As explorações selecionadas possuíam, em média, 68 animais em produção (Quadro 2). Das 22 explorações que efetuam registos, encontravam-se, em média, 12 vacas com menos de 60 dias em lactação (DIM), 14 vacas entre os 61 e 120 DIM, 13 vacas nos 121 a 180 DIM, 37 vacas com mais de 180 DIM e 21 vacas no período seco.

**Quadro 2 – Caracterização das explorações estudadas relativamente aos animais em produção.**

Exploração	Vacas em produção					Vacas Secas
	Total	<60DIM	61-120DIM	121-180DIM	>180DIM	
1	128	24	22	24	58	32
2*	50	ND	ND	ND	ND	ND
3*	25	ND	ND	ND	ND	ND
4	53	12	7	9	25	18
5	41	13	6	7	15	12
6*	37	ND	ND	ND	ND	ND
7	117	17	25	20	55	33
8	86	8	20	13	45	20
9	122	18	19	19	66	36
10*	85	ND	ND	ND	ND	ND
11	75	10	17	13	35	18
12	119	28	19	20	52	12
13	100	15	22	16	47	13
14	54	10	8	8	28	8
15	49	10	8	10	21	23
16	80	4	23	6	47	21
17	86	11	24	17	34	30
18	134	18	15	22	79	41
19*	79	ND	ND	ND	ND	ND
20	35	7	7	3	18	5
21	133	20	20	29	64	45
22	51	8	9	11	23	17
23	49	11	6	4	28	22
24	56	5	11	16	24	20
25	33	4	5	4	20	15
26	49	11	11	9	18	18
27*	50	ND	ND	ND	ND	ND
28*	23	ND	ND	ND	ND	ND
29	19	5	2	3	9	6
30*	22	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Média</b>	<b>68</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>37</b>	<b>21</b>
<b>SD</b>	<b>35,9</b>	<b>6,4</b>	<b>7,3</b>	<b>7,4</b>	<b>19,3</b>	<b>10,9</b>
<b>P<sub>10</sub></b>	<b>24,8</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>8,4</b>
<b>P<sub>90</sub></b>	<b>122,6</b>	<b>19,8</b>	<b>22,9</b>	<b>21,8</b>	<b>63,4</b>	<b>35,7</b>

Os dados apresentados foram recolhidos através do contraste efectuado no mês referente à realização do inquérito na exploração.

ND: Dado não disponível, explorações que não efectuam contraste nem possuem registos.

SD: Desvio padrão da amostra

P<sub>10</sub>: Décimo percentil

P<sub>90</sub>: Nonagésimo percentil



**Quadro 3 – Caracterização das explorações estudadas relativamente à produção de leite.**

Exploração	Produção		Proteína		Gordura		Ureia
	kg/vaca/ano	Kg/vaca/dia	%	kg/dia	%	kg/dia	(mg/kg)
1	11356	35,5	3,16	1,12	3,58	1,27	281
2*	10106	33,1	3,27	1,08	3,88	1,28	286
3*	8411	27,6	3,14	0,87	3,65	1,01	251
4	9755	31,4	3,20	1,01	4,03	1,27	257
5	7709	25	3,29	0,82	3,57	0,88	207
6*	6748	22,1	3,15	0,70	4,00	0,88	238
7	8831	26,7	3,32	0,89	4,29	1,15	283
8	10859	32,3	3,21	1,04	2,97	0,96	272
9	9705	33	3,28	1,08	3,35	1,10	285
10*	10901	35,7	3,14	1,12	3,41	1,22	335
11	9259	29,7	3,28	0,97	3,81	1,13	267
12	10367	30,2	3,31	1	3,12	0,94	368
13	10513	31,6	3,3	1,04	3,45	1,09	337
14	8740	33,6	3,21	1,08	3,47	1,18	318
15	10706	38,6	3,27	1,26	3,73	1,44	295
16	10127	29,5	3,3	0,97	3,66	1,08	319
17	10170	31,6	3,27	1,03	4,07	1,29	368
18	9442	32,8	3,4	1,13	3,8	1,27	342
19*	8208	26,9	3,24	0,87	3,88	1,04	288
20	8165	30,8	3,25	1	4,05	1,25	265
21	9315	29,5	3,41	1,01	3,1	0,86	310
22	10303	36,1	3,25	1,17	3,5	1,26	354
23	9399	28,8	3,2	0,92	2,54	0,71	225
24	9701	25,6	3,48	0,89	3,89	1	310
25	11348	31,8	3,43	1,09	3,94	1,25	307
26	9866	29,4	3,21	0,94	3,04	0,89	284
27*	6133	20,1	3,21	0,64	3,77	0,76	332
28*	7692	25,2	3,18	0,80	4,02	1,01	210
29	6963	24,6	3,23	0,79	4,09	1,01	305
30*	4877	16	3,27	0,52	3,90	0,62	219
<b>Média</b>	<b>9189</b>	<b>30</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>291</b>
<b>SD</b>	<b>1576,8</b>	<b>4,9</b>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	<b>0,40</b>	<b>0,20</b>	<b>44,5</b>
<b>P<sub>10</sub></b>	<b>6941,5</b>	<b>24,4</b>	<b>3,16</b>	<b>0,78</b>	<b>3,09</b>	<b>0,85</b>	<b>224,4</b>
<b>P<sub>90</sub></b>	<b>10863,2</b>	<b>35,5</b>	<b>3,40</b>	<b>1,12</b>	<b>4,05</b>	<b>1,27</b>	<b>343,2</b>

Os resultados apresentados foram recolhidos através do contraste efectuado no mês referente à data de recolha de dados na exploração.

\*Explorações que não efectuam contraste. Resultados obtidos a partir dos registos de qualidade de leite da Agros no mês referente à data de recolha de dados na exploração.

X: Média aritmética da amostra

SD: Desvio padrão da amostra

P<sub>10</sub>: Décimo percentil

P<sub>90</sub>: Nonagésimo percentil

Nas 30 explorações estudadas, no período de 28 de fevereiro a 5 de abril de 2013, a produção de leite diária era, em média, de 29,5 kg/vaca/dia, com teores em gordura e em proteína de, respetivamente 3,65% e 3,26%, e produções de gordura e de proteína de, respetivamente 0,96 e 1,07 kg/vaca/dia (Quadro 3). A produção média aos 305 dias era, em média, de 9189,2 kg/vaca.

### **2.2.2. Efeito do uso de adsorvente**

A avaliação dos efeitos do uso de adsorvente de micotoxinas nos parâmetros hematológicos foi realizada entre 15 de março e 17 de abril numa exploração comercial de bovinos de leite situada em Modivas, Vila do Conde, com um efetivo de 90 animais. De acordo com o contraste leiteiro realizado em março, aquando do início do trabalho experimental, 35 vacas encontravam-se em produção e cinco vacas no período de secagem. Dos animais em produção, sete encontravam-se nos primeiros 60 DIM, sete com 61 a 120 DIM, três com 121 a 180 DIM e dezoito com mais de 180 DIM. Relativamente ao número de lactação, 11 animais estavam na primeira lactação, cinco na segunda, nove na terceira, quatro na quarta e seis na quinta lactação e acima desta. A produção média de leite desse mês foi de 30,8 kg/vaca/dia, com teores médios de proteína de 3,25% (o que corresponde a cerca de 1 kg de proteína/dia) e de gordura de 4,05% (1,25 kg de gordura/dia). A produção média aos 305 dias era de 8165 kg/vaca.

A dieta dos animais era constituída por 37 kg de silagem de milho, 10 kg de alimento concentrado complementar e 1,7 kg de palha, fornecida uma única vez ao início do dia, sob a forma de alimento completo.

O ensaio teve início com o contacto do proprietário à Subsecção de Nutrição Animal da CAVC. Foram descritas quebras de ingestão, quebras de produção, diarreia e claudicações em alguns dos animais em produção, coincidentes com a abertura de um silo trincheira no qual estava conservada silagem de milho.

Efetuuou-se a visita à exploração no dia 15 de março para analisar o problema e verificaram-se as condições de conservação da silagem e da mistura de matérias-primas. Procedeu-se à recolha de amostras de sangue a 12 vacas (13,8% do efetivo), oito destas em produção (22,9% do total em produção) e quatro em período seco (80% do total de vacas neste grupo). Dos animais em produção, metade manifestava sinais clínicos, sendo a outra metade constituída por animais sem quaisquer sinais de doença. A recolha foi realizada na veia caudal mediana, utilizando tubos com EDTA para realização do hemograma e tubos sem anticoagulante para o proteinograma, de acordo com as instruções do laboratório. Duas das amostras em tubos com EDTA coagularam antes de a análise poder ser realizada, pelo que ficaram inviabilizadas. Procedeu-se, ainda, à recolha de uma amostra de dieta completa (TMR) para pesquisa de micotoxinas. A amostra foi recolhida em vários pontos da manjedoura, tendo sido congelada para não sofrer deterioração até à análise. A pesquisa e quantificação de micotoxinas foram realizadas no laboratório da Alltech®, nos EUA, por LC-MS (Cromatografia Líquida – Espetrometria de Massa) com capacidade para deteção de 38 micotoxinas.

No mesmo dia, após a recolha de amostras de sangue, foi incluído Mycosorb® na dieta a uma dose de 15 g/vaca/dia, durante 33 dias. No início deste período, quatro animais

apresentaram diarreia, anorexia, quebra de produção e debilidade nos membros posteriores que os impossibilitava de se manterem em estação, adotando a postura de “cão-sentado”. Após exame clínico excluíram-se as causas mais frequentes de síndrome de vaca caída, nomeadamente, hipocalcemia, toxemia decorrente de mamite ou metrite severas, torção de abomaso e patologias músculo-esqueléticas. Um dos animais manifestava, com severidade, os sinais clínicos supracitados pelo que foi eutanasiado e sujeito a necrópsia pelo Médico Veterinário responsável, sem diagnóstico definitivo possível. À necrópsia observou-se apenas uma ligeira enterite, com muco de coloração acinzentada no lúmen. O gânglio linfático que drenava a região encontrava-se também alterado, pelo que, com o objetivo de se proceder ao isolamento bacteriano, foi enviado juntamente com a porção intestinal afetada para um laboratório de referência.

Procedeu-se, ainda, à recolha de duas amostras de água para consumo animal, para análise química e microbiológica. Efetuou-se nova recolha de amostras de sangue, aos mesmos animais, no dia 17 de abril, precisamente uma semana após a vacinação do efetivo com uma vacina polivalente (Rispoval4® da empresa farmacêutica Pfizer Animal Health®) que inclui vírus inativados de rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e vírus vivos modificados de parainfluenza e de BRSV (vírus respiratório sincicial bovino). A recolha de amostras de sangue foi realizada de igual forma na veia caudal mediana, com 12 tubos sem anticoagulante e 10 tubos com EDTA (uma vez que duas das análises anteriormente realizadas ficaram inviabilizadas) para proteinograma e hemograma, respetivamente.

### **2.2.3. Análise estatística**

Os dados relativos às 30 explorações foram analisados segundo um modelo misto, considerando os efeitos do uso de adsorvente, da vacinação, do robot de ordenha e da adesão a programa de qualidade do leite, nos vários parâmetros avaliados no programa MIKO® (saúde animal, incidência de patologias, produção de leite, índices reprodutivos, manejo das forragens, manejo do alimento composto e manejo alimentar), a exploração como efeito aleatório e o erro residual aleatório. Os parâmetros saúde animal, incidência de patologias, produção de leite, índices reprodutivos, manejo das forragens, manejo do alimento composto e manejo alimentar foram, ainda, sujeitos a uma análise de fatores, com rotação varimax. Os dados relativos ao hemograma e ao proteinograma foram sujeitos a análise de variância simples considerando o efeito fixo do período (antes e depois da inclusão do Mycosorb) e o erro residual. Sempre que existiram diferenças significativas o teste de Tukey foi utilizado para comparação de médias. Todos os dados foram analisados recorrendo ao programa SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Análise de Maneio – PROGRAMA MIKO®

No Quadro 4 apresentam-se os efeitos do uso de adsorvente, da prática de vacinação, do robot de ordenha e da adesão a programa de qualidade do leite nos vários parâmetros avaliados pelo programa MIKO®. O uso de adsorvente afetou o manejo do alimento composto, o manejo das forragens, a gestão alimentar e a saúde animal. A prática de vacinação apenas apresentou uma tendência de efeito no manejo das forragens, tendo esta tendência também sido verificada com o robot de ordenha. Já a adesão a programa de qualidade do leite apenas apresentou uma tendência de efeito no manejo do alimento composto.

- **Saúde Animal**

As explorações que incluem 7 a 10 g/vaca/dia de Mycosorb®, na dieta, apresentam uma condição geral dos animais significativamente melhor do que as restantes (94,3%; Quadro 4). A estas seguem-se as explorações que mantêm uma dose de 4 a 5 g/vaca/dia de Mycosorb® (91,5%), seguidas de explorações que não usam adsorvente (86,6%) e de explorações que usam outro adsorvente de micotoxinas na dieta dos animais (85,8%). Estes resultados poderão ser explicados pelo efeito do adsorvente à base de parede celular de leveduras que, não só previne a absorção gastrointestinal das micotoxinas eventualmente presentes na dieta, como também estimula o sistema imunitário devido ao efeito imunomodulador dos  $\beta$ -D-glucanos da parede de *S. cerevisiae* (Avantaggio *et al.* 2009).

- **Maneio das forragens**

Relativamente às forragens, constata-se que as explorações que usam Mycosorb® possuem, em média, um manejo das forragens significativamente melhor do que as restantes, sendo que, aquelas cuja dose ronda os 4 a 5 g/vaca/dia são, efetivamente, as que possuem o melhor manejo (82,5%), seguindo-se as explorações que incluem 7 a 10 g/vaca/dia (77,3%), as que não usam adsorvente (75,2%) e, finalmente, as que usam outro adsorvente de micotoxinas na dieta das vacas leiteiras (70,6%). As explorações com melhor manejo das forragens incluem uma dose considerada “preventiva” na dieta dos animais (4 a 5 g/vaca/dia) e possuem, usualmente, um melhor manejo geral da exploração, com maiores produções de leite e melhores condições gerais dos animais. Os resultados sugerem que os produtores com maior tendência para encarar as silagens como um dos principais focos de contaminação fúngica, tendem a preveni-la com um bom manejo das forragens e com a inclusão de Mycosorb® na dieta.

- **Maneio dos alimentos compostos e concentrados**

Relativamente ao manejo dos alimentos concentrados e das misturas de alimentos obtiveram-se resultados algo distintos. As explorações com o melhor manejo são aquelas que

não usam qualquer adsorvente de micotoxinas na dieta (83,1%). Seguem-se as que usam Mycosorb® a uma dose de 4 a 5 g/vaca/dia (80,4%), as que incluem 7 a 10 g/vaca/dia (75,9%) e, por último, as que incluem outro adsorvente de micotoxinas na dieta que não Mycosorb® (75,5%). A apresentação do alimento composto e a forma como o mesmo é armazenado poderão explicar os resultados obtidos. Constata-se que, mais de metade das explorações que não usam adsorvente de micotoxinas na dieta (55,6%) adquire os alimentos concentrados à CAVC sob a forma de granulado e que, um terço das mesmas (33,3%) o armazena nos próprios sacos. Estes valores são bastante mais elevados do que aqueles observados nos restantes grupos, em que a grande maioria dos produtores armazena em silos verticais a mistura de matérias-primas, composta por alimento granulado e farinado. Estes dados favorecem o resultado obtido nestas explorações por dois motivos. Em primeiro, devido à apresentação do alimento composto que, sendo granulado, apresenta menor risco de contaminação fúngica do que os alimentos farinados, uma vez que o seu processo de produção poderá reduzir significativamente as UFC fúngicas e estabilizar temporariamente o alimento (Genter *et al.* 2007). Em segundo lugar, a sua conservação nestas explorações geralmente não possibilita grande acumulação de detritos e de crescimento fúngico, uma vez que o alimento é mantido nos sacos em que foram transportados, sendo que a taxa de utilização é geralmente elevada devido às quantidades adquiridas.

- **Maneio alimentar**

No que respeita à alimentação dos animais, verifica-se que as explorações que possuem um melhor maneio são as que usam outro adsorvente de micotoxinas incorporado na mistura de matérias-primas (90,5%), seguidas das explorações com incorporação de 4 a 5 g/vaca/dia de Mycosorb® (88,9%) e daquelas que não utilizam qualquer tipo de adsorvente de micotoxinas na dieta (85,1%). As explorações que usam Mycosorb® a uma dose de 7 a 10 g/v/dia (75,1%) são de facto as que têm um pior maneio alimentar, ou seja, pior maneio na preparação do alimento completo, no número de vezes que alimentam os animais, na limpeza da manjedoura e do equipamento de unifeed e no uso que fazem do refugo (alguns dos produtores fornecem o refugo às novilhas, às próprias vacas em produção ou até mesmo às vacas no período seco). Há por isso uma tendência para se usar uma dose maior de Mycosorb® nestas explorações, de forma a prevenir eventuais problemas de contaminação por micotoxinas.

- **Explorações vacinadas, explorações com robot de ordenha e programa de qualidade do leite**

Embora apenas tenha sido observada uma tendência, as explorações que possuem robot de ordenha e as que não praticam vacinação são aquelas que possuem melhor maneio de forragem (80,7% e 80,1% respetivamente).

**Quadro 4 – Efeito do uso de adsorvente, da prática de vacinação, da presença de robot de ordenha e da utilização de programas de qualidade de leite na produção de leite, na saúde dos animais e no manejo geral da exploração. Resultados apresentados sob a forma de percentagem.**

	Adsorvente					P	Prática de Vacinação		EPM	P	Robot de ordenha			P	Programa de Qualidade de Leite				P
	Sem	Outro	Mycosorb 4 a 5g/v/d	Mycosorb 7 a10g/v/d	EPM		Ausente	Presente			Ausente	Presente	EPM		Ausente	Presente	EPM	Ausente	
N	9	6	11	4			6	24			26	4			17	13			
Incidência de patologias	0,61	0,64	0,66	0,71	0,047	0,399	0,69	0,62	0,032	0,141	0,66	0,65	0,030	0,818	0,65	0,66	0,038	0,788	
Produção de Leite	0,90	0,89	0,96	0,96	0,055	0,523	0,91	0,95	0,038	0,512	0,91	0,94	0,035	0,646	0,94	0,92	0,045	0,586	
Índices Reprodutivos	0,58	0,54	0,53	0,63	0,059	0,585	0,57	0,57	0,040	0,971	0,61	0,53	0,037	0,294	0,59	0,56	0,048	0,536	
Maneio do Alimento Composto	0,83	0,76	0,80	0,76	0,018	0,001	0,79	0,78	0,015	0,644	0,77	0,80	0,014	0,113	0,78	0,80	0,015	0,073	
Maneio das Forragens	0,75	0,71	0,83	0,77	0,034	0,034	0,80	0,73	0,023	0,051	0,72	0,81	0,022	0,058	0,75	0,78	0,028	0,256	
Maneio Alimentar	0,85	0,91	0,89	0,75	0,034	0,010	0,83	0,87	0,026	0,271	0,82	0,88	0,024	0,223	0,86	0,84	0,028	0,348	
Saúde Animal	0,87	0,86	0,92	0,94	0,025	0,044	0,90	0,89	0,017	0,818	0,90	0,89	0,016	0,734	0,90	0,90	0,021	0,968	
CCS	222,09	216,80	194,93	251,76	44,493	0,773	207,52	235,27	30,455	0,559	212,13	230,66	28,376	0,741	235,94	206,85	36,159	0,426	
Total	0,77	0,756	0,80	0,79	0,017	0,122	0,79	0,77	0,013	0,490	0,772	0,79	0,012	0,437	0,78	0,78	0,014	0,907	

Estes resultados poderão ser explicados pelo maior reconhecimento, por parte destes produtores, da importância de uma manejo alimentar adequado na produtividade da sua exploração. As explorações que praticam programa de qualidade do leite têm, de igual forma, um melhor manejo do alimento concentrado que adquirem à CAVC (79,9% em contraponto com 77,5%).

### 2.3.2. Análise de fatores

Os dados recolhidos pelo programa MIKO® foram sujeitos a uma análise de fatores com o objetivo de identificar questões redundantes no inquérito e associações entre variáveis. No Quadro 5 apresentam-se os três fatores retidos segundo o critério Mineigen. O Fator 1 explicou 23,5% de variância, o Fator 2 19,7% e o Fator 3 17,2%. Nas Figuras 1, 2 e 3 apresentam-se as relações entre os fatores após rotação varimax.

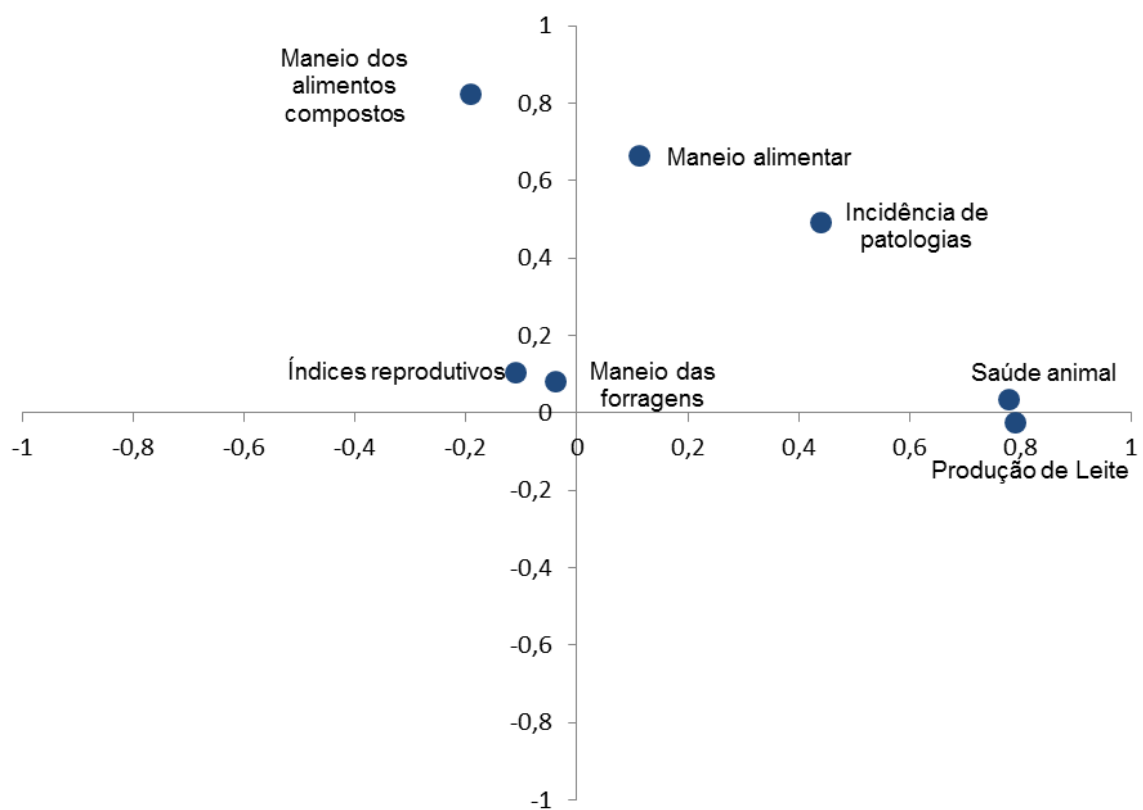
A variável “produção de leite” encontra-se representada no Fator 1, estando a “saúde animal” repartida nos fatores 1 e 2. A associação das duas variáveis no Fator 1 corrobora a estreita relação existente entre a produtividade e a saúde animal, ou seja, quanto melhor a condição geral dos animais maior será a sua produtividade (Stilwell 2013).

As variáveis “manejo do alimento composto” e “manejo alimentar” estão representadas no Fator 2, podendo esta associação ser explicada pelo facto de o manejo geral de uma exploração incluir, entre outros procedimentos, o armazenamento apropriado da mistura de matérias-primas e, também, um manejo adequado no que diz respeito à alimentação dos animais. Assim, os produtores que possuem boas práticas de armazenamento tendencialmente praticam boas práticas de alimentação animal, sendo que o contrário também se verifica.

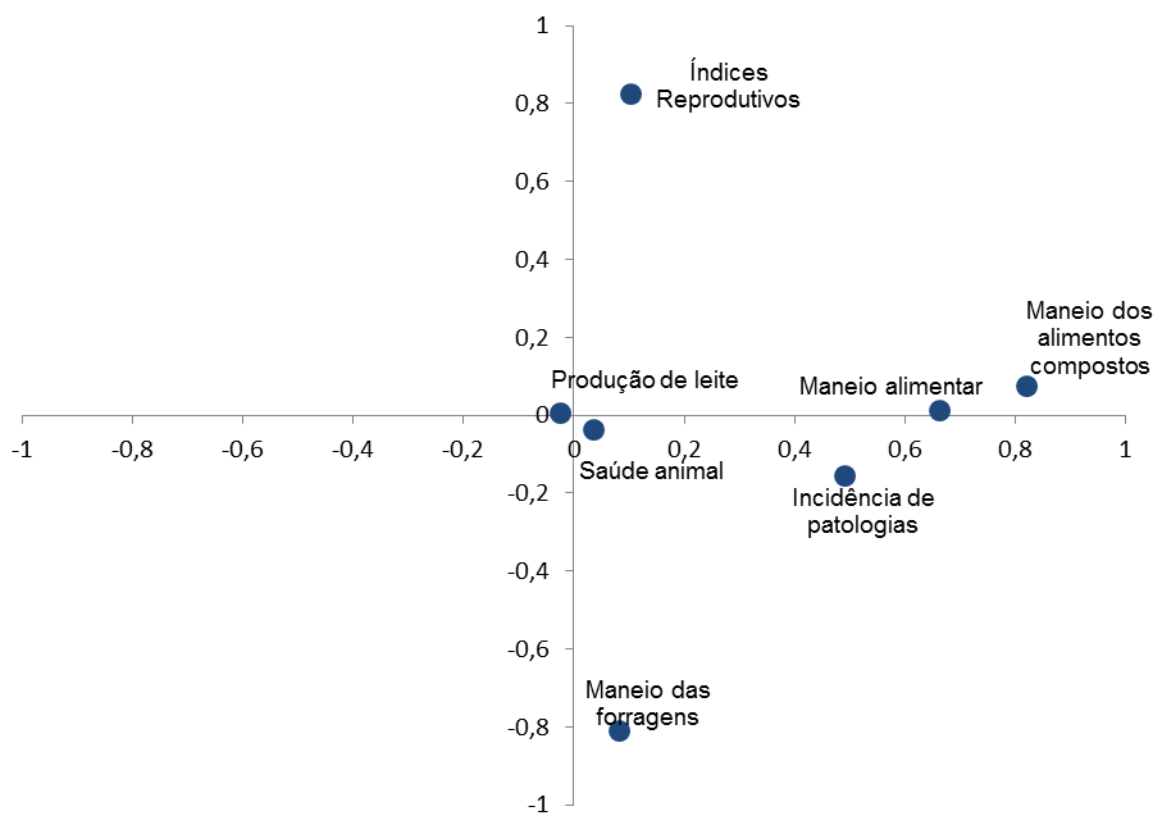
As variáveis “índices reprodutivos” e “manejo das forragens” encontram-se representadas no Fator 3, mas com sentidos diferentes. Deve-se salientar que os índices de fertilidade dependem não só das decisões do produtor, nomeadamente no que respeita aos DIM e à duração do período voluntário de espera, como também dos nível de produção e da colocação em prática de programas de fertilidade.

**Quadro 5 – Fatores retidos segundo o critério Mineigen na análise de fatores.**

Variáveis	F1	F2	F3	Comunalidades
Produção de Leite	0,790	-0,025	0,007	0,625
Incidência de patologias	0,441	0,491	-0,156	0,459
Índices reprodutivos	-0,109	0,104	0,823	0,700
Manejo do alimento composto	-0,191	0,822	0,074	0,718
Manejo da forragem	-0,038	0,082	-0,809	0,662
Manejo alimentar	0,114	0,663	0,011	0,453
Saúde animal	0,779	0,036	-0,039	0,609
Variância (%)	23,5	19,7	17,2	-

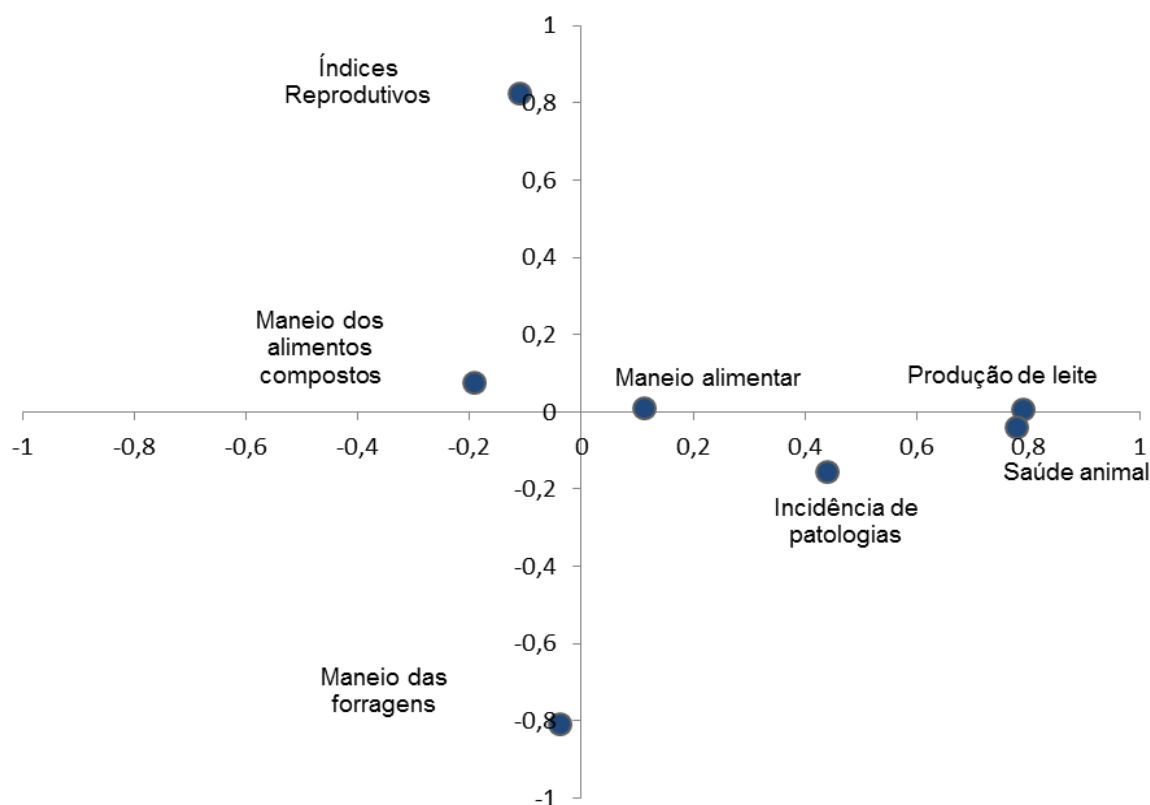


**Figura 1 – Relação entre os fatores 1 e 2.**



**Figura 2 – Relação entre os fatores 2 e 3.**





**Figura 3 – Relação entre os fatores 1 e 3.**

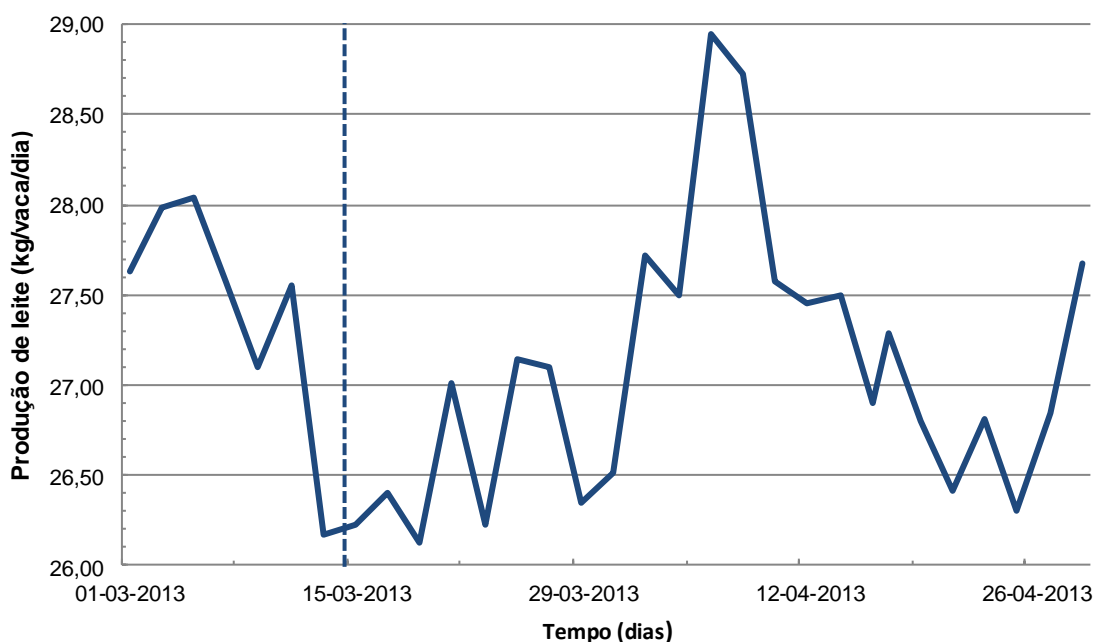
Aqui, talvez se possa inferir que explorações com melhores produções tendem a ter um maior cuidado no manejo da forragem, mas piores índices reprodutivos. Estes últimos poderão ser explicados pelo balanço energético negativo (BEN) mais acentuado decorrente de produções mais elevadas. Nestas, a dinâmica hormonal poderá estar alterada refletindo-se na incidência de ovários quísticos que poderá aumentar, no retorno à atividade cíclica que poderá ser mais tardio com anestros pós-parto mais longos, nas taxas de concepção que poderão ser mais baixas e nas taxas de morte embrionária que poderão, também, aumentar (Rossi *et al.* 2008).

### **2.3.3. Efeito do uso de adsorvente**

Aquando da visita à exploração “problema”, para observação das condições de manejo alimentar, constatou-se que a silagem se encontrava mal conservada, com um cheiro característico a bolor e que as paredes internas do silo de armazenamento do alimento composto se encontravam com bastante sujidade e incrustações. Ambos os fatores poderão ter contribuído para um maior risco de proliferação fúngica e uma possível contaminação por micotoxinas (Fink-Gremmels 2010; Santin 2010).

A produção durante os meses de março e abril foi registada, utilizando os dados de recolha de leite da Agros. Pode verificar-se, pela análise da Figura 4, que ocorre uma tendência de

quebra de produção, com alguma flutuação, no início do mês de março. A diminuição de 982 kg de leite (28 kg/vaca/dia), produzidos no dia 5 de março, para 916 kg de leite (26 kg/vaca/dia), produzidos no dia 13 de março, representa uma quebra de produção de 6,7% no período de 8 dias. Durante o tempo de inclusão de Mycosorb® há um lento aumento de produção, também com alguma flutuação, até atingir um máximo de 1013 kg de leite (29 kg/vaca/dia), produzidos no dia 6 de abril, o que corresponde a um aumento de cerca de 10,3%.



**Figura 4 – Produção de leite diária, na exploração, durante os meses de março e abril (kg/vaca/dia). A inclusão do adsorvente na dieta iniciou-se a 15 de março, marcado pela linha a tracejado.**

Estes dados poderiam ser o reflexo de alterações no efetivo, no entanto o número de animais em produção manteve-se sensivelmente estável. A produção torna a descer até um mínimo de 921 kg de leite produzidos por dia no dia 25 de abril. Estas flutuações de produção poderão ter ocorrido devido à variação da dose incluída na dieta, uma vez que esta não foi medida rigorosamente pelo produtor. Várias outras causas poderão estar também estar subjacentes a esta oscilação na produção de leite, como por exemplo rejeições de leite de vacas com mastite clínica, patologias metabólicas (cetose), mastites subclínicas e deslocamentos de abomaso (Stilwell 2013), informação não registada pelo produtor, pelo que não é possível inferir com certeza a justificação desta flutuação.

No que respeita ao isolamento bacteriano do material de necrópsia enviado para o laboratório, obteve-se resultados negativos, não se tendo isolado nenhum microrganismo patogénico.

A água recolhida encontrava-se imprópria para consumo humano do ponto de vista, quer

microbiológico, quer químico. As contagens de aeróbios mesófilos totais a 33 °C e a 22 °C foram de 98 UFC/ml e mais de 300 UFC/ml, respetivamente. A contagem de coliformes totais foi de 45 UFC/ml e de enterococos fecais de 9 UFC/ml. Não se observou crescimento de *Clostridium perfringens* e de *Escherichia coli* (0 UFC/ml). Sendo a *E.coli* um microrganismo pouco resistente no meio ambiente, comparativamente com os enterococos fecais, esta análise da água permite concluir que a contaminação fecal não foi um episódio recente, pelo que poderá não estar relacionada com os casos que surgiram na exploração em março de 2013 (Duarte 2011). Relativamente aos resultados da análise química, a concentração de nitratos (190mg/l) e de manganês (120µg/l) foram os únicos parâmetros alterados. Isto poderá surgir em virtude da intensa atividade agrícola da região, em que a poluição azotada dos solos e de lençóis freáticos ocorre não só devido ao uso de fertilizantes como também à existência de inúmeras explorações leiteiras (Cabrita 2003). No entanto, a concentração de nitratos não é suficientemente elevada para provocar sinais clínicos em bovinos, uma vez que até valores de 3000 mg/l não surgem, normalmente, intoxicações por nitratos nesta espécie (Stilwell 2013). A análise de micotoxinas (Quadro 6) permite constatar a presença de fusariotoxinas, maioritariamente tricotecenos do tipo B e fumonisinas, mas também ácido fusárico, neosolaniol (tricoteceno do tipo A) e, ainda, esterigmatocistina, produzida por espécies de *Aspergillus sp.* (Santin 2010). A análise efetuada sugere, portanto, a infeção da cultura de milho por *Fusarium sp.*, que poderá ter ocorrido previamente à colheita ou durante a conservação inadequada no silo por manutenção incompleta de condições de anaerobiose (Fink-Gremmels 2010; Santin 2010). Verifica-se que o DON e os seus derivados, nomeadamente 15-acetil-DON e DON-3-glicosídeo, encontram-se no TMR a níveis de 353 ppb, 977 ppb e 146 ppb, respetivamente, o que corresponde a um total de 1476 ppb. As fumonisinas, que incluem FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>, estavam presentes no alimento completo a níveis de 6421 ppb.

Relativamente a ácido fusárico e a neosolaniol constata-se que estavam presentes a uma concentração de 269,9 ppb e de 5,1 ppb, respetivamente. Já a esterigmatocistina encontrava-se a 1,9 ppb no alimento completo.

Os teores de micotoxinas detetados encontram-se abaixo dos valores de orientação estabelecidos na Recomendação 2006/576/CE (Quadro 11 que se encontra em Anexo), nomeadamente no que respeita ao DON e derivados, cujos níveis correspondem a cerca de 1,3 mg/kg (ppm) de alimento com um teor de humidade de 12% (inferior a 5 ppm) e também no que respeita a fumonisinas, cujas concentrações correspondem a cerca de 5,7 mg/kg de alimento com um teor de humidade de 12% (inferior a 50 ppm). Apesar disso, as micotoxinas presentes na dieta (particularmente DON e Fumonisin) parecem ter influenciado negativamente a produção e saúde animal.

**Quadro 6 – Resultados da análise de micotoxinas por LC-MS (Programa Miko37+ da Alltech®) de alimento completo.**

	Micotoxinas analisadas	Níveis detectados (µg/kg MS)	SD (µg/kg MS)
1	Aflatoxina B <sub>1</sub>	ND	ND
2	Aflatoxina B <sub>2</sub>	ND	ND
3	Aflatoxina G <sub>1</sub>	ND	ND
4	Aflatoxina G <sub>2</sub>	ND	ND
5	Ocratoxina A	ND	ND
6	Ocratoxina B	ND	ND
7	Desoxinivalenol	353	15,9
8	3-Acetil-Desoxinivalenol	ND	ND
9	15-Acetil-Desoxinivalenol	977	191,1
10	DON-3-Glicosídeo	146	67,3
11	Nivalenol	ND	ND
12	Fusarenona X	ND	ND
13	Toxina T2	ND	ND
14	Toxina HT2	ND	ND
15	Diacetoxiscirpenol	ND	ND
16	Neosolaniol	5,1	0,5
17	Fumonisinina B1	5994,1	322,3
18	Fumonisinina B2	361	77,8
19	Fumonisinina B3	65,9	18,2
20	Zearalenona	ND	ND
21	α Zearalanol	ND	ND
22	β-Zearalanol	ND	ND
23	Zearalanona	ND	ND
24	Patulina	ND	ND
25	Ácido Micofenólico	ND	ND
26	Roquefortina C	ND	ND
27	Ácido Penicílico	ND	ND
28	Vortmanina	ND	ND
29	Gliotoxina	ND	ND
30	Esterigmatocistina	1,9	0.0
31	Verruculogeno	ND	ND
32	2-Bromo-Alfa-Ergocriptina	ND	ND
33	Ergometrina/Ergonovina	ND	ND
34	Ergotamina	ND	ND
35	Lisergol	ND	ND
36	Metilergonovina	ND	ND
37	Alternariol	ND	ND
38	Ácido Fusárico	269,9	45,1

ND – Não detetado, níveis de micotoxinas abaixo do limiar de deteção.

Isto poderá ser explicado pelo maior stress produtivo a que estes animais estão sujeitos, pelo maior nível de ingestão (que resulta numa maior taxa de passagem e numa maior absorção das micotoxinas ingeridas) e, principalmente, devido ao efeito sinérgico que poderá ter resultado da presença concomitante de ácido fusárico com DON e Fumonisininas (Jouany & Diaz 2010; Manning 2010). Além da capacidade que esta micotoxina possui de acentuar os efeitos de outras, presentes na mesma matriz alimentar, há também que realçar o efeito

negativo que esta apresenta na flora ruminal. Com efeito, *Ruminococcus albus* e *Methanobrevibacter ruminantium* são as espécies maioritariamente inibidas (Jouany & Diaz 2010), pelo que poderão surgir alterações da capacidade de digestão dos hidratos de carbono estruturais e de eliminação do hidrogénio resultante da fermentação no rúmen. A acumulação deste produto de reação pode inibir o crescimento e o metabolismo de outros microrganismos ruminais, induzindo assim desequilíbrios na flora e afetando, consequentemente, o processo fermentativo, o que poderá explicar as diarreias observadas em alguns dos animais em produção (Hook *et al.* 2010).

No que respeita aos resultados do hemograma e do proteinograma obtiveram-se diferenças significativas nos valores de proteínas plasmáticas totais (PPT), gamaglobulinas (imunoglobulinas ou anticorpos) e betaglobulinas do período 1 (sem adsorvente incluído na dieta) para o período 2 (após a inclusão de adsorvente), sendo que os valores das duas primeiras aumentaram e o da última diminuiu, como se pode observar no Quadro 7.

Num estudo realizado anteriormente por Korosteleva *et al.* (2007) em vacas leiteiras, no qual foram fornecidas dietas contaminadas por fusariotoxinas, obtiveram-se resultados que contrastam com os expostos no presente relatório. Observaram-se aumentos das PPT e das globulinas com diminuição da concentração de IgA (imunoglobulina A) e da relação albumina:globulina, sendo que a incorporação de adsorventes à base de parede celular de *S. cerevisiae* minimizou estes efeitos. Num outro estudo obtiveram-se aumentos das concentrações de imunoglobulinas como resposta à vacinação em animais expostos a fusariotoxinas. Foi proposto que a concentração de micotoxinas presentes no alimento, bem como a presença de micotoxinas conjugadas e as interações estabelecidas entre elas são fatores que poderão modular a resposta imunitária dos animais, sendo que níveis baixos de micotoxinas poderiam ter efeito de estimulação do sistema imunitário, devido ao aumento da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, enquanto níveis elevados o deprimiriam como consequência do aumento da fragilidade de membranas celulares e da apoptose de leucócitos (Korosteleva *et al.* 2009).

O aumento das gamaglobulinas poderá ser explicado pela vacinação efetuada uma semana antes da segunda recolha de amostras de sangue. A vacinação é um dos métodos *in vivo* utilizados para a avaliação da atividade da imunidade humoral, pelo que o aumento desta fração proteica após a vacinação sugere uma resposta imunitária adequada (Surai & Dvorska 2010; Taylor-Pickard 2010). Os resultados obtidos permitem inferir que a adição de Mycosorb® na dieta poderá ter diminuído a absorção de micotoxinas pelos animais, reduzindo o efeito imunodepressor e permitindo a resposta vacinal. Os efeitos negativos no sistema imunitário exercidos pelas micotoxinas encontradas na análise supracitada (principalmente DON e fumonisinas) poderão dever-se à diminuição de síntese proteica e à fragilidade celular decorrente de instabilidade membranar (Surai & Dvorska 2010; Taylor-Pickard 2010).

**Quadro 7 – Efeito da inclusão de 15 g/vaca/dia de Mycosorb<sup>®</sup>, na dieta, nos parâmetros hematológicos de vacas leiteiras.**

Parâmetro	Mycosorb <sup>®</sup>				Valores de referência	
	Sem	Com	EPM	P	Min.	Máx.
<b>Hemograma</b>						
Proteínas Plasmáticas Totais (g/dl)	7,19	7,95	0,241	0,039	6,0	8,5
Albumina:Globulina (g/dl)	0,49	0,46	0,017	0,166	0,6*	1,3*
Albumina (g/dl)	2,35	2,42	0,063	0,447	2,9*	3,9*
α-Globulinas (g/dl)	1,29	1,40	0,050	0,124	0,5*	0,8*
β-Globulinas (g/dl)	1,40	1,05	0,106	0,031	0,8*	2,0*
γ-Globulinas (g/dl)	2,16	2,90	0,148	0,002	0,5*	1,8*
<b>Proteinograma</b>						
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	8,54	7,04	0,471	0,170	4,0	13,8
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μl)	6,11	5,94	0,282	0,661	5,0	10,0
Hemoglobina (g/dl)	10,28	9,71	0,501	0,436	8,0	15,4
Hematócrito (%)	26,79	25,48	1,266	0,475	24,0	46,0
Volume Corpuscular Médio (fL)	43,84	43,02	0,667	0,396	40,0	60,0
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	16,83	16,36	0,258	0,208	11,1	17,0
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dl)	38,42	38,02	0,153	0,084	34,0	38,0
Distribuição Eritrócitos (%)	20,29	18,61	1,276	0,366	23,3	33,6
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl)	457,22	370	64,65	0,354	100	800
Volume Plaquetas (fL)	6,52	8,61	0,832	0,095	-	-
Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	4,47	3,04	0,665	0,149	1,1	3,6
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,21	0,30	0,055	0,294	0,0	0,7
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,05	0,06	0,007	0,598	0,0	0,3
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,72	0,48	0,093	0,078	0,2	1,3
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	3,02	3,11	0,238	0,792	4,0	9,8

Os valores de referência expostos são os apresentados pelo laboratório aquando da receção dos resultados da análise hematológica.

\*Valores de referência não apresentados pelo laboratório, tendo sido recolhidos através do estudo de Lumsden *et al.* (1980). Os resultados obtidos não deverão ser, por isso, rigorosamente comparados com os intervalos de referência assinalados, uma vez que poderão não se adequar completamente ao presente estudo. Foram, no entanto, colocados intencionalmente para permitir a contextualização dos resultados da análise hematológica.

O aumento das PPT poderá ser explicado por uma diminuição da perda gastrointestinal, por uma recuperação da capacidade hepática de produção proteica ou por uma menor perda proteica a nível renal. A perda gastrointestinal leva, geralmente, a diminuições das concentrações de albumina e de globulinas, descrita como pan-hipoproteínemia (Nelson & Couto 2009). Visto que vários animais apresentavam diarreia antes da inclusão de Mycosorb<sup>®</sup> poder-se-á depreender, talvez, que os resultados obtidos se devem a algum grau de perda proteica a nível GI que diminui após a inclusão do adsorvente e a subsequente supressão do quadro clínico manifestado inicialmente. A análise do Quadro 10 permite verificar que o aumento das PPT ocorreu, essencialmente, à custa do aumento das concentrações de

albumina, de alfa globulinas e de gama globulinas, estas últimas já clarificadas. O aumento das alfa globulinas pode ter ocorrido, devido a menor perda gastrointestinal ou como resposta a um eventual estado inflamatório e, até mesmo, devido ao decurso da gestação. Durante a gestação ocorre um aumento progressivo desta fração proteica, diminuindo aproximadamente um mês antes do parto (Zvorc *et al.* 2000). Além de não existirem, nos resultados do hemograma obtido no período de inclusão do adsorvente, outros indicadores que corroborem a presença de uma resposta inflamatória, as diferenças obtidas nas concentrações de alfa globulinas não foram significativamente diferentes. O aumento da albumina poderá também estar relacionado com uma menor perda gastrointestinal. No entanto, as diferenças obtidas antes e durante a inclusão de Mycosorb® no que respeita a esta fração proteica não foram estatisticamente significativas.

As betaglobulinas são um grupo de proteínas constituído por transferrina, por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), por proteínas do sistema de complemento e pela proteína C reativa. A elevação destas duas últimas ocorre em estados inflamatórios, pelo que o facto de ter ocorrido uma diminuição das betaglobulinas com a incorporação do adsorvente sugere um estado inflamatório durante o primeiro período da fase experimental, antes da inclusão do adsorvente (Li & Fang 2004; Trindade *et al.* 2008).

A patologia inflamatória do tubo digestivo poderá, por isso, ser a causa desta elevação no período 1, uma vez que, além do quadro de diarreia que algumas das vacas em produção apresentavam, confirmou-se a existência de enterite no animal que foi sujeito a necrópsia. Poder-se-á observar, ainda, um ligeiro grau de neutrofilia nos resultados da primeira análise hematológica, o que sugere também a existência de um estado inflamatório prévio à inclusão de Mycosorb® no alimento completo.

No hemograma não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas, no entanto, os valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e de volume de plaquetas foram significativamente diferentes, sendo que o primeiro diminuiu e o segundo aumentou. Valores elevados de CHCM poderão ocorrer devido a hemoglobinémia (presença de hemoglobina livre no plasma) que poderá ter ocorrido devido a hemólise *in vivo* ou *in vitro* (Stilwell 2013). Uma vez que um dos efeitos das micotoxinas é o aumento da instabilidade da membrana celular e da peroxidação lipídica, o valor mais elevado de CHCM antes da inclusão de Mycosorb® poderá ser indicativo de algum grau de hemólise intravascular resultante de uma maior fragilidade dos eritrócitos (Wannemacher 1997; Taylor-Pickard 2010).

O volume das plaquetas varia de forma inversa com a sua contagem. Isto significa que diminuições na contagem de plaquetas se encontram associadas a aumentos no seu volume e que aumentos nesta mesma contagem estão associados a um menor volume plaquetário (Bessman *et al.* 1981). De acordo com Gentry *et al.* (1987), verifica-se que os tricotecenos, mais precisamente as toxinas T2 e HT2, possuem capacidade de inibição da função das

plaquetas, o que, teoricamente, poderia explicar as contagens mais elevadas antes da inclusão de Mycosorb®. Uma vez que estas toxinas induzem inibição da agregação plaquetária, o Mycosorb® adicionado posteriormente poderá ter permitido um retorno à função normal, com uma taxa de renovação maior devido à sua maior atividade, logo uma menor concentração celular e um maior volume de plaquetas. Contudo, não se detetaram estas micotoxinas no TMR analisado, pelo que se pode questionar se outras micotoxinas poderão ter algum efeito na função plaquetária *in vivo*.

### 3. CONCLUSÃO

O presente estudo permite corroborar o impacto que as micotoxinas provocam na saúde da vaca leiteira como também na sua capacidade produtiva. Apesar de ser comumente aceite que os bovinos possuem maior resistência à micotoxicose, é importante realçar que a mesma depende de fatores internos e externos ao animal. A prevenção é, por isso, extremamente importante e deve ser suportada em boas práticas agrícolas e num manejo adequado na exploração, preferencialmente associados a métodos que permitam minimizar a absorção de micotoxinas pelo animal, nomeadamente através da incorporação de adsorventes na dieta. Estes poderão ser incluídos como plano preventivo ou como estratégia de controlo quando os passos prévios falharam na eliminação da sua presença. A existência de protocolos ou programas que permitam um diagnóstico precoce das explorações que apresentam maior risco de exposição a micotoxinas é, nesse sentido, de extrema importância. O programa MIKO®, disponibilizado pela Alltech® para o desenvolvimento do presente estudo, torna-se por isso imprescindível, uma vez que permite ao produtor a avaliação e melhoria da exploração, através da deteção de pontos críticos e da implementação de medidas de controlo que visam minimizar o risco de micotoxinas. No entanto, considerando os diferentes sistemas de produção e as realidades subjacentes à produção de leite a nível global seria necessário, talvez, ajustar o protocolo de avaliação de forma a maximizar a precisão do mesmo, evitando o mais possível as fontes de erro.

No presente estudo verificou-se que as explorações que incorporam adsorventes à base de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, na dieta dos seus animais, apresentam melhores indicadores gerais de saúde animal. No entanto, não se obteve diferenças significativas nos índices de patologias infecciosas e metabólicas, nos índices reprodutivos e na produção de leite. O acompanhamento técnico cuidado e informado das explorações estudadas, levado a cabo pela CAVC, permite a melhoria contínua das práticas agrícolas e do manejo praticado nas explorações. Isto poderá explicar os resultados, no sentido em que, mais do que tentar “remediar” quando as micotoxinas já se encontram presentes, é necessário sobretudo prevenir a ocorrência das mesmas.



Na exploração “problema”, o uso de adsorvente (Mycosorb®) numa dieta contaminada por fusariotoxinas afetou as concentrações de proteínas séricas circulantes. Uma vez que a contaminação da dieta poderá resultar numa maior predisposição a patologias devido à imunodepressão provocada por estes compostos, os objetivos do uso de adsorventes baseiam-se na redução da suscetibilidade a infeções e a patologias metabólicas como também na diminuição das quebras de ingestão, de produção e na prevenção do agravamento dos índices reprodutivos. Nessa perspetiva, a análise hematológica poderá possibilitar o estudo indireto do estatuto imunitário dos animais, sendo que os resultados obtidos mostram uma clara diferença nos níveis de PPT, betaglobulinas e gamaglobulinas. Neste estudo, especificamente, as diferenças obtidas poderão resultar da resposta vacinal efetiva (indicativa de capacidade de resposta imune) e de uma menor perda proteica pelo tubo digestivo.

Pode concluir-se, deste modo, que o uso de adsorventes à base de *Saccharomyces cerevisiae* parece celular de permite mitigar os efeitos nocivos que os metabolitos fúngicos alvo de estudo exercem no sistema imunitário dos animais, diminuindo subsequentemente a incidência de patologias infecciosas e todas as consequências produtivas e económicas que delas resultam.

## 4. BIBLIOGRAFIA

- Akande KE, Abubakar MM, Adegbola TA, Bogoro SE (2006) "Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review" **Pakistan Journal of Nutrition** 5, 398-403
- Bennett JW, Klich M (2003) "Mycotoxins" **Clinical Microbiology Reviews** 16, 497-516
- Bessman J, Williams L, Gilmer PR Jr. (1981) "Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles" **American Journal of Clinical Pathology** 76, 289-293
- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J (2007) "Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients" **Animal Feed Science and Technology** 137, 265-282
- Blank R, Rolfs JP, Sudekum KH, Frohlich AA, Marquardt RR, Wolfram S (2003) "Effects of Chronic Ingestion of Ochratoxin A on Blood Levels and Excretion of the Mycotoxin in Sheep" **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 6899-6905
- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot MC, Fremy JM, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, Avantaggiato G (2009) "Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety" **Scientific Report submitted to EFSA** 1
- Cabrita ARJB (2003) "Influência da suplementação azotada de silagens de milho nas funções ruminal e lactogénica de vacas leiteiras" **Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias**, Universidade do Porto – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
- Caloni F, Spotti H, Auerbach HO, Camp JF, Fink-Gremmels J, Pompa G (2000) "In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora" **Veterinary Research Communication** 24, 379-387
- Cheli, F., et al., Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim. Feed Sci. Tech.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.013>
- Dawson K, Evans J, Kudupoje M (2001) "Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding" in Jacques KA, Lyons TP (Ed.) **Science and Technology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium**, Nottingham University Press, 169-182
- Devegowda G, Raju MVLN, Afzali N, Swamy HVLN (1998) "Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction" in Lyons TP, Jacques KA (Ed.) **Biotechnology in the Feed Industry**, Nottingham university Press, 241-256
- Diaz D, Hopkins BA, Leonard LM, Hagler WM, Whitlow LW (2000) "Effect of fumonisin on lactating dairy cattle" **Journal of Veterinary Science** 83, 1171

- Diaz DE, Hagler WM, Blackwelder JT, Eve JE, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW (2004) "Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed" **Mycopathologia** 157, 233-226
- Diaz ED, Smith KT (2010) "Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 323-339
- Diaz DE, Whitlow LW, Hagler WM (2011) "Mycotoxins in feed" **Feedstuffs** 89
- Driehuis F, Spanjer FC, Scholten JM, Giffel MC (2008) "Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes." **Journal of Dairy Science** 91, 4261-4271
- Duarte PB (2011) "Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos" **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais
- Fernandez M, Stolhandeske-Dale S, Zentner RP, Pearse P, (2001) "Progress in management of Fusarium head blight" in Proceedings of the Second Canadian Workshop on Fusarium Head Blight (Ed.), 241-256
- Fink-Gremmels J (2008) "The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows" **Veterinary Journal** 176, 84-92
- Fink-Gremmels J (2010) "Mycotoxins in forages" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 249-268
- Freixial RMC, Barros JFC (2012) "Pastagens" **Texto de apoio para as Unidades Curriculares de Sistemas e Tecnologias Agropecuárias, Noções Básicas de Agricultura e Tecnologia do Solo e das Culturas**, Universidade de Évora – Escola de Ciências e Tecnologia
- Galvano F, Galofaro V, Galvano G (1996) "Occurrence and Stability of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A Worldwide Review" **Journal of Food Protection** 59, 1079-1090
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Fusconi G, Galvano M, Piva A, Piva G (1996) "Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons" **Journal of food protection** 59, 551-554
- Galvano F, Ritieni A, Piva G, Pietri A (2010) "Mycotoxins in the human food chain" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 187-224
- Genter MB, Hagler WM, Hansen JA, Jones FT, Mowrey BA, Poore MH and Whitlow LW (2007) "Understanding and Coping with Effects of Mycotoxins in Livestock Feed and Forage" in Jones FT (Ed.) North Carolina Cooperative Extension Service, 1-21
- Gentry P, Ross M, Bondy G (1987) "Inhibitory effect of trichothecene mycotoxins on bovine platelets stimulated by platelet activating factor" **Canadian Journal of Veterinary Research** 51, 490–494
- Gimeno A, Martins ML (2006) **Mycotoxins and mycotoxicosis in animals and humans**, 2<sup>o</sup> Ed,

Special Nutrients Inc.

- Gurung NK, Rankins Jr, Shelby RA (1999) "In vitro ruminal disappearance of fumonisin B1 and its effects on in vitro dry matter disappearance" **Veterinary and human toxicology** 41, 196-199
- Harris B, Staples C (2008) "The problems of Mycotoxins in Dairy Cattle Rations" **Animal Science Department DS31**
- Hook S, Wright AD, McBride B (2010) "Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies" **Archaea** 2010, 1-11
- Jones C, Heinrichs AJ, Roth GW, Ishler VA (2004) **From Harvest to Feed: Understanding Silage Management**
- Jouany JP (2007) "Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds" **Animal Feed Science and Technology** 137, 342-362
- Jouany JP, Yiannikouris A, Bertin G (2009) "Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products" **Options Méditerranéennes A** 85, 95-101
- Jouany JP, Diaz DE (2010) "Effects of mycotoxins in ruminants" *in* Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 295-321
- Korosteleva S, Smith T Boermans H (2007) "Effects of Feedborne Fusarium Mycotoxins on the Performance, Metabolism, and Immunity of Dairy Cows" **Journal of Dairy Science** 90, 3867–3873
- Korosteleva S, Smith T Boermans H (2009) "Effects of feed naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows" **Journal of Dairy Science** 92, 1585–1593
- Kutz RE, Sampson JD, Pompeu LB, Ledoux DR, Spain JN, Vázquez-Añón M, Rottinghaus GE (2009) "Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1" **Journal of Dairy Science** 92, 3959–3963
- Li J-J, Fang C-H (2004) "C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases" **Medical Hypotheses** 62, 499–506
- Lumsden J, Mullen K, Rowe R (1980) "Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle" **Canadian Journal of Comparative Medicine** 44, 24-31
- Manning B (2010) "Mycotoxins in aquaculture" *in* Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 139-156
- Murphy PA, Hendrich S, Hopmans EC, Hauck CC, Lu Z, Buseman G, Munkvold G, (2001) "Effect of processing on fumonisin content of corn" *in* Jackson LS, Devries JW, Bullerman LB (Ed.) **Fumonisin in Food**, 323-334
- Nelson R, Couto C (2009) **Small Animal Internal Medicine**, 4<sup>o</sup> Ed, Mosby Elsevier, 360-364
- Pinto CA (2010) "Hematúria Enzoótica Bovina: Contribuição para o seu estudo etiopatogénico" **Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias**, Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária

- Pittet A (1998) "Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An update review" **Revue de Médecine Vétérinaire**, 479-492
- Rossi F, Righi F, Fuochi S, Quarantelli A (2009) "Effects of Mycotoxins on Fertility of Dairy Cow" **Annali della facoltà di medicina veterinaria di Parma XXIX**, 153-166
- Rossi F, Righi F, Romanelli S, Quarantelli A (2008) "Reproductive Efficiency of Dairy Cows Under Negative Energy Balance Conditions" **Annali della facoltà di medicina veterinaria di Parma XXVIII**, 173-180
- Santin E (2010) "Mould growth and mycotoxin production" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 225-234
- Santos RR, Fink-Gremmels J (2010) "Penicillium moulds and effects on rumen health" **2010 Dairy Solutions Symposium, rumen Health: a 360° Analysis**
- Smith TK, Korosteleva SN (2010) "The significance of feed-borne mycotoxins in ruminant nutrition" in Gonçalves E, Felicio JD, Aquino S (Ed.) **Mycotoxins in Animals Economically Important**, Nova Science Publishers Inc, 35-66
- Stanley VG, Ojo R, Woldesenbet S, Hutchinson DH (1993) "The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks" **Poultry Science** 72, 1867-1872
- Stilwell G (2013) **Clínica de Bovinos**, Lisboa: Publicações Ciência & Vida
- Surai PF, Dvorska JE (2010) "Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup> Ed, Nottingham University Press, 93-137
- Taylor-Pickard J (2010) "The impact of mycotoxins on immunity and vaccination responses" **International Hatchery Practice** 24
- Trindade JMF, Dantas AT, Duarte ALBP, Marques CDL (2008) "O sistema complemento" **Temas de Reumatologia Clínica** 9, 17-23
- Wannemacher RW and Wiener SL (1997) "Textbook of Military Medicine" in Sidell FR, Takafuji ET and Franz DR (Ed.) **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare - Trichothecene Mycotoxins**, Office of The Surgeon General Department of the Army, United States of America, 655-676
- Whitaker TB, Slate AB, Johansson AS (2010) "Sampling feeds for mycotoxin analysis" in Diaz D (Ed.) **The mycotoxin blue book**, 3<sup>o</sup>Ed, Nottingham University Press, 9-31
- Yiannikouris A, Francois J, Poughon L, Dussap C-G, Bertin G, Jeminet G, Jouany J-P (2004) "Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall" **Journal of Food Protection** 67, 1195-1200
- Zvorc Z, Matijatko V, Beer B, Foršek J, Bedrica L, Kucer N (2010) "Blood serum proteinograms in pregnant and non-pregnant cows" **Veterinarski Arhiv** 70, 21-30

## 5. ANEXOS

**Quadro 8 – Amostras recolhidas pela Alltech® Portugal em 2012, no concelho de Vila de Conde, para pesquisa de micotoxinas.**

	Amostra	Aflatoxinas (ppb)	Tricotecenos do tipo B (ppb)	Tricotecenos do tipo A (ppb)	Fumonisinias (ppb)	Micotoxinas de silagem (ppb)
1	Silagem de milho	0	0	0	5473.5	97.91
2	Silagem de erva	0	0	0	5.53	0
3	Mistura de matérias-primas	0	151.07	63.95	3433.27	0
4	Silagem de milho	43.21	0	0	1036.41	0
5	Silagem de erva	0	33.28	0	835.57	0
6	Silagem de milho	0	1241.29	5.03	1314.77	0
7	Silagem de milho	0	0	0	220.58	0
8	Silagem de milho	0	502.83	0	2526.74	0

1. Aflatoxinas = Aflatoxina B1 + B2 + G1 + G2  
 2. Tricotecenos do tipo B = Desoxinivalenol (DON) + DON 15-acetil + DON 3-acetil + Fusarenona X + Nivalenol + DON-3-Glucosídeo  
 3. Tricotecenos do tipo A = T-2 + HT-2 + Diacetoxiscirpenol (DAS) + Neosolaniol  
 4. Fumonisinias= Fumonisina B1 + B2 + B3  
 5. Micotoxinas de silagem = Gliotoxina + Patulina + Ácido Penicílico+ Roquefortina C + Ácido micofenólico + verruculogeno + vortmanina

**Quadro 9 – Regulamento (CE) Nº 1831/2003 da Comissão de 19 de Dezembro de 2003 referente aos teores de contaminantes presentes nos géneros alimentícios.**

### SECÇÃO 2: MICOTOXINAS

Géneros alimentícios (1)		Teores máximos (µg/kg)		
	Aflatoxinas	B1	Somatário de B1, B2, G1 e G2	M1
2.1				
2.1.8	Leite cru <sup>(6)</sup> , leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	-	-	0,050
2.1.11	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	-	-	0,025
2.1.12	Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup> especificamente destinados a lactentes	0.10	-	0,025

**Quadro 10 – Regulamento (UE) Nº 574/2011 DA Comissão de 16 de Junho de 2011 referente aos teores de Aflatoxina B1 nos alimentos para animais.**

### ANEXO I – SECÇÃO II: MICOTOXINAS

Substância indesejável	Produtos destinados à alimentação animal	Limite máximo em mg/kg (ppm) de alimento para um teor de humidade de 12%
1. Aflatoxina B1	Matérias-primas para alimentação animal.	0,02
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais	0,01
	com excepção de:	
	- alimentos compostos para bovinos leiteiros e vitelos, ovinos leiteiros e cordeiros, caprinos leiteiros e cabritos, leitões e aves de capoeira jovens,	0,005
	- alimentos compostos para bovinos (excepto bovinos leiteiros e vitelos), ovinos (excepto ovinos leiteiros e cordeiros), caprinos (excepto caprinos leiteiros e cabritos), suínos (excepto leitões) e aves de capoeira (excepto aves de capoeira jovens)	0,02

**Quadro 11 – Recomendação da Comissão de 17 de Agosto de 2006 (2006/576/CE).**

**ANEXO - VALORES DE ORIENTAÇÃO**

Micotoxina	Produtos destinados à alimentação animal	Valor de orientação em mg/kg (ppm) de alimento para animais para um teor de humidade de 12%
Desoxinivalenol	Matérias-primas para alimentação animal (*)	
	- Cereais e produtos à base de cereais (**) com excepção dos subprodutos do milho	8
	- Subprodutos do milho	12
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais, com excepção de:	5
	- Alimentos complementares e alimentos completos para suínos	0,9
	- Alimentos complementares e alimentos completos para vitelos (< 4 meses), borregos e cabritos	2
Zearalenona	Matérias-primas para alimentação animal (*)	
	- Cereais e produtos à base de cereais (**) com excepção dos subprodutos do milho	2
	- Subprodutos do milho	3
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais	
	- Alimentos complementares e alimentos completos para leitões e marrãs (porcas jovens)	0,1
	- Alimentos complementares e alimentos completos para porcas e suínos de engorda	0,25
	- Alimentos complementares e alimentos completos para vitelos, vacas leiteiras, ovelhas (incluindo borregos) e cabras (incluindo cabritos)	0,5
Ocratoxina A	Matérias-primas para alimentação animal (*)	
	- Cereais e produtos à base de cereais (**)	0,25
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais	
	- Alimentos complementares e alimentos completos para suínos	0,05
	- Alimentos complementares e alimentos completos para aves de capoeira	0,1
Fumonisin B1 + B2	Matérias-primas para alimentação animal (*)	
	- milho e produtos à base de milho (***)	60
	Alimentos complementares e alimentos completos para:	
	- suínos, cavalos (equídeos), coelhos e animais de companhia	5
	- peixes	10
	- aves de capoeira, vitelos (< 4 meses), borregos e cabritos	20
	- ruminantes adultos (> 4 meses) e martas	50

**Quadro 12 – Métodos de análise e de detecção de micotoxinas.**

<b>Tipo de ensaio</b>	<b>Método de análise</b>	<b>Características</b>
<b>Ensaio rápidos</b>	ELISA – Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)	Em placas de microtitulação em suporte sólido ou em “dipstick” ou em ELISA de fluxo lateral; ELISA competitivo em que a toxina presente na amostra compete com um conjugado toxina-enzima marcado: ausência de resposta é considerado um resultado positivo devido ao impedimento do sinal indicador da ligação anticorpo-conjugado; Falsos positivos com alguma frequência.
<b>Ensaio de referência</b>	TLC – Cromatografia em camada fina (Thin-Layer Chromatography)	Ensaio bastante seguro para determinar micotoxinas ou grupos de micotoxinas; Não permite a quantificação das micotoxinas detetadas caso não lhe seja associado outro ensaio como, por exemplo, a densitometria.
	HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography)	Elevada sensibilidade, não necessita de um elevado índice de detecção; separação dos componentes de uma matriz, por afinidade com uma coluna estacionária e com um solvente líquido, que passam posteriormente por um detetor que os quantifica; Falsos positivos devido à interferência de impurezas eventualmente presentes no extrato líquido caso as operações anteriores de preparação não sejam realizadas adequadamente.
	LC-MS – Cromatografia líquida-Espetrometria de massa (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)	Elevada sensibilidade e especificidade; Detecção e identificação de vários grupos de micotoxinas, inclusive fumonisinas, micotoxinas conjugadas (não detetáveis por outros testes) e produtos de reação ou de metabolização das micotoxinas; Separação física de componentes de uma matriz, através de cromatografia líquida, e posterior análise por espectrometria de massa em que se procede à ionização de compostos químicos e identificação das partículas através da razão entre a sua massa e carga.
	GC – Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)	Usada na análise de micotoxinas não detetáveis por HPLC (tricotecenos tipo-A – toxina T-2, toxina HT-2, DAS, Neosolaniol); Utilização na determinação de outras micotoxinas encontra-se limitada devido a volatilidade insuficiente e à existência de ensaios mais úteis neste âmbito.